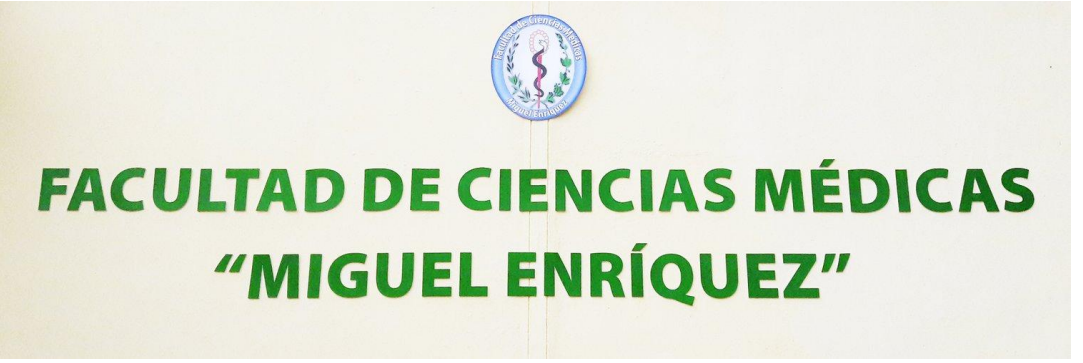



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS.**

# ADN mitocondrial relacionado a la infertilidad por el varicocele.

**Tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas.**

**Dr.Mauricio Martí Brenes.**

**Tutores:**

**Prof. Dr. C. Manuel López Pérez (España),**
**Prof. Dr. C. Julio César Morales Concepción (Cuba).**

**2005**

## Dedicatoria.

**A mis padres.**
**A mi esposa.**
**A mis hijos.**


## AGRADECIMIENTOS

**A mi familia, sin su ayuda, nada en mi vida habría sido posible.**
**A mis tutores.**
**A mis pacientes.**

**INTRODUCCIÓN.**

**CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.**

**CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODO.**

**CAPITULO 3. ENSAYO CLINICO.**

**CAPITULO 4. EVIDENCIAS PRELIMINARES.**

**CAPITULO 5. DESARROLLO Y DISCUSIÓN.**

**CONCLUSIONES.**

**RECOMENDACIONES.**

**BIBLIOGRAFÍAS Y ANEXOS.**

## Sumario.

**La revisión actual se centra en la relación entre factores testiculares internos involucrados en daño en el ADN y su relación con el varicocele. El varicocele se considera una de las principales etiologías de la infertilidad masculina. Junto con**

**parámetros alterados del semen, se cree que el aumento de la fragmentación del ADN juega un papel importante en la inducción de varicocele en la esterilidad. El daño del ADN puede resultar de factores intra o extra testiculares. Entre estos, la apoptosis, el empaque anormal de**

**cromatina y el estrés oxidativo son los más investigados. Evidencia significativa sugiere que los varicoceles tienen un efecto nocivo en la función de los testículos y una varicocelectomía no solo previenen la disminución progresiva de la función testicular, sino también revierte el**

**daño. Sin embargo, el grado en que la reparación del varicocele mejora las tasas de embarazo y el éxito de la tecnología de reproducción asistida (ART) sigue siendo controvertido. También se discute la reparación del varicocele en la fragmentación del ADN. (Mohammad**

**Hossein Nasr Esfahani, Ph.D. y**

**Marziyeh Tavalaee, M.Sc.)**

## Capitulo 1. MARCO TEÓRICO.

**Enfermedades asociadas al ADN mitocondrial.**

**Son desórdenes resultantes de la deficiencia de una o más proteínas localizadas en las mitocondrias e involucradas en el metabolismo. Hay descritas unas 150 mutaciones que acaban en enfermedades de distinto**

**tipo.**

**-La disfunción mitocondrial es considerada una vía común en una serie de enfermedades, tanto agudas como crónicas, por el fenómeno del estrés oxidativo y la generación de la respuesta inflamatoria sistémica.**

**-Síndrome de depleción de ADN mitocondrial. Síndrome de**

**Agotamiento de ADNMitocondrial (MDS - Mitocondrial DNA depletion Syndrome- por sus siglas en inglés), hace referencia a un grupo de enfermedades autosómicas recesivas que causan un significativo desgaste del ADN mitocondrial en los tejidos afectados.**

**La mayor parte del material genético se encuentra en los cromosomas en el interior del núcleo de la célula, pero**

**las mitocondrias, unos orgánulos del interior celular que producen la energía que se utiliza en el metabolismo, también contienen una pequeña cantidad de ADN denominado ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial (ADNmt) se encuentra fuera de los cromosomas de una célula, en la mitocondria. El ADNmt solo se hereda de la madre. De manera que todos los hijos de una mujer tienen el mismo**

**ADNmt. Los hijos de las hijas de esta mujer tienen también el mismo ADNmt y así sucesivamente.**

**El ADN mitocondrial (ADNmt) o genoma mitocondrial es un material genético de las mitocondrias, los elementos de la célula que generan energía para la misma. Se trata de un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el**

**interior de las mitocondrias celulares.**

**Las mitocondrias son orgánulos celulares que desempeñan funciones esenciales para la fisiología de la célula. La disfunción mitocondrial puede originarse por mutaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA) o nuclear (nDNA) o por otras causas que afectan secundariamente al metabolismo mitocondrial.**

**Hay muchas condiciones causadas por el mal funcionamiento de las mitocondrias y se las denominan "enfermedades mitocondriales".**

**El factor común entre estas enfermedades es que las mitocondrias son incapaces de generar suficiente energía para que las células funcionen bien.**

**-El síndrome de Leigh o encefalomielopatía necrotizante subaguda es una enfermedad neurológica progresiva definida por las características neuropatológicas específicas asociadas a las lesiones del tronco cerebral y de los ganglios basales. Su prevalencia al nacer se ha estimado en 1/36.000.**

**-El síndrome MELAS (miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y episodios semejantes a apoplejías) es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por episodios agudos neurológicos comparables a la apoplejía, asociados a la hiperlactatemia y la miopatía mitocondrial.**

## HERENCIA MATERNA O MITOCONDRIAL.

**Esto se debe a que las mitocondrias no pasan del espermatozoide al ovocito en la fecundación, por ello también se llama herencia materna, aunque también haya genes nucleares que se hereden también por la línea materna.**

**-La Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) o Atrofia óptica de Leber**

**es una degeneración de los gangliocitos de la retina y sus axones, heredada mitocondrialmente (de la madre a todos sus hijos), que conlleva una pérdida aguda o subaguda de visión central. Esto afecta predominantemente a varones adultos jóvenes.**

**El ADN nuclear y el ADN mitocondrial son diferentes en muchos aspectos; de entrada, por la ubicación y la estructura. El ADN nuclear se encuentra dentro del**

**núcleo de las celulares eucariotas y tiene dos copias por célula. El ADN mitocondrial está ubicado en las mitocondrias y contiene 100-1000 copias por célula.**

**Son transcritos por una ARN polimerasa mitocondrial específ ica. El ácido ribonucleico (ARN o RNA) es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas**

**como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN).**

**-El síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis, en inglés HNPCC, es una condición hereditaria que incrementa la probabilidad de presentar cáncer de colon y cáncer de recto y en menor**

**medida cáncer de endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, páncreas.**

**-Síndrome de Lesch-Nyhan. El síndrome de Lesch-Nyhan (LNS) es la forma más grave del déficit de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT), un trastorno hereditario del metabolismo de las purinas asociado con una sobreproducción de ácido úrico (AU),**

**discapacidad neurológica y problemas de conducta.**

**-El síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas, denominado abreviadamente como síndrome MERRF por sus siglas en inglés (myoclonic epilepsy with ragged red fibers), es una rara enfermedad mitocondrial que cursa principalmente con mioclonias y**

**epilepsia.**

**-El Síndrome de Turcot, también denominado "Síndrome de tumor cerebral y poliposis" o "Síndrome de glioma y poliposis", es un trastorno hereditario caracterizado por el desarrollo de neoplasias malignas en el sistema nervioso central (por ejemplo, glioblastoma multiforme o meduloblastoma) asociadas a poliposis.**

**-El síndrome de Cowden (SC) es una genodermatosis infradiagnosticada y difícil de reconocer que se caracteriza por la presencia de múltiples hamartomas en diversos tejidos y un alto riesgo de padecer cáncer de mama, tiroides, endometrio, riñón y colorrectal.**

**-El síndrome de Li-Fraumeni (LFS) es una enfermedad rara autosómica**

**dominante que afecta a pacientes jóvenes y que consiste en una predisposición a desarrollar un amplio rango de tumores. El riesgo de desarrollar un segundo cáncer, especialmente un cáncer inducido por radiaciones, es alto.**

**-La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad mitocondrial**

**neurodegenerativa que afecta al nervio óptico y que se caracteriza por una pérdida súbita de la visión en los adultos jóvenes que son portadores.**

**-La amaurosis congénita de Leber (LCA) es una enfermedad de la retina (retinopatía) de origen genético, caracterizada por un grave déficit visual en los niños desde los primeros meses de vida. Se produce una pérdida grave**

**tanto de bastones como de conos en toda la retina desde el nacimiento. Defectos genéticos. Las personas con albinismo usualmente sufren de deterioro a la vista extendido al grado de ceguera parcial, aunque pocos presentan ceguera total.**
**Amaurosis congénita de Leber puede causar ceguera total o gran pérdida de visión desde el nacimiento o la infancia.**

**-El síndrome de Cohen es una rara enfermedad de origen genético que se transmite con un patrón autosómico recesivo. Se caracteriza por la asociación de obesidad, hipotonía, retraso mental, microcefalia, dismorfia cráneofacial típica, así como incisivos centrales grandes y salientes, con dedos finos en forma de huso.**

**-El síndrome de Cockayne (SC) es**

**una enfermedad multisistémica caracterizada por estatura baja, apariencia facial característica, envejecimiento prematuro, fotosensibilidad, disfunción neurológica progresiva y discapacidad intelectual.**

**-El síndrome de Gardner es una variante de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por numerosos**

**pólipos adenomatosos en la superficie mucosa intestinal, que tienen un alto potencial de malignidad.**

**-El síndrome de Peutz-Jeghers es una afección genética que provoca el desarrollo de tumores no cancerosos en el aparato digestivo. Los tumores, llamados pólipos hamartomatosos, usualmente se desarrollan en el intestino delgado. También pueden desarrollarse**

**en el estómago o en el intestino grueso.**

**-El síndrome de Gorlin-Goltz (SGG) es un trastorno hereditario autosómico dominante que predispone principalmente a la proliferación de tumores como los carcinomas basocelulares y queratoquistes maxilares. Está causado por la mutación del gen Patched localizado en el cromosoma 9.**

**-La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es una enfermedad hereditaria infrecuente que se incluye entre los síndromes de poliposis intestinal, caracterizada por la aparición de gran número (más de 100 en la forma clásica) de pólipos del tipo adenomatoso (tumores benignos) en el colon y recto a partir de los 20 o 30**

**“En las últimas dos décadas, se han identificado numerosas mutaciones tanto en el mtDNA como en el nDNA, como causantes de un número importante de los síndromes clínicos mitocondriales. Síntomas y signos clínicos idénticos pueden ser causados por mutaciones diferentes en los genes mitocondriales o nucleares y la misma mutación puede producir fenotipos**

**completamente diferentes. Entre estos nos encontramos con enfermedades multisistémicas encuadradas en síndromes claramente definidos (síndromes de Leigh, NARP, MELAS, MERRF, Kearns-Sayre, Pearson, oftalmoplejia crónica progresiva externa, depleción), con afectación de un solo órgano (neuropatía óptica hereditaria de Leber, sordera), o con enfermedades que se nombran por los órganos afectados.**

**Se han llevado a cabo análisis epidemiológicos para evaluar la prevalencia de la enfermedad mitocondrial y, aunque se trata de enfermedades raras, tienen un impacto importante en la comunidad y en las familias. El diagnóstico temprano de estas enfermedades es un desafío muy importante. Por otra parte, desde finales de los años 90, se ha observado que la variación genética del mtDNA es un**

**factor relevante en el desarrollo de las enfermedades multifactoriales asociadas a la edad y en la longevidad y se están acumulando evidencias acerca del papel de las mutaciones en el mtDNA y el desarrollo del cáncer.**

**Es muy difícil resumir el reto que supone el tratamiento terapéutico de las enfermedades mitocondriales puesto que están compuestas por un grupo heterogéneo de fenotipos que abarcan**

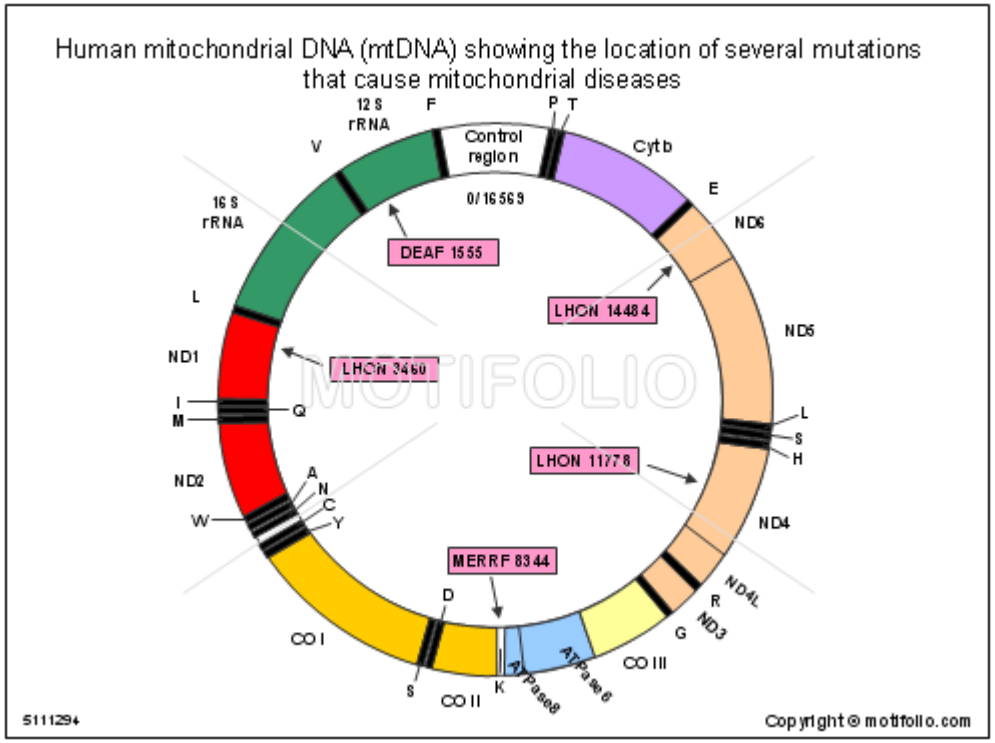
**todos los tipos de especialidades médicas. Por ello, las estrategias terapéuticas son diversas y específicas, siendo inconcebible un "tratamiento mágico" para tratar todas las enfermedades. La mayoría de los tratamientos disponibles son sintomáticos y de apoyo. Los tratamientos sintomáticos se basan fundamentalmente en fármacos, transfusiones de sangre, cirugía,**

**medidas dietéticas y fisioterapia. El tratamiento farmacológico puede ser específico (por ejemplo en el tratamiento de la epilepsia), no específico (antioxidantes, aceptores y donadores de electrones, cofactores, etc.), o restringido (evitar fármacos de conocida toxicidad para la mitocondria). A pesar de las posibilidades tan limitadas, se deben de ofrecer tratamientos sintomáticos pues pueden tener un**

**impacto sobre el curso y resultado de la enfermedad”. (Julio Montoya. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza).**

**El genoma mitocondrial posee infinidad de ventajas para estudiar relaciones evolutivas: Debido a su menor tamaño, el estudio del ADNmt es más fácil que el del ADN nuclear; además se puede extraer en grandes cantidades, porque**

**cada célula tiene varias mitocondrias. El ADNmt evoluciona más rápido y no se recombina, pasando intacto entre generaciones salvo por las mutaciones; facilitando la identificación de las relaciones entre organismos muy parecidos.**


Human mitochondrial DNA (mtDNA) showing the location of several mutations that cause mitochondrial diseases
12 S rRNA
F
P
T
Control region
Cyt b
E
ND6
ND5
L
S
H
ND4
ND4L
R
ND3
G
CO III
ATPase 6
ATPase 8
K
CO II
S
D
CO I
W
A
N
C
Y
ND2
I
M
Q
ND1
L
16 S rRNA
V
0/16569
DEAF 1555
LHON 14484
LHON 3460
LHON 11778
MERRF 8344
MOTIFOLIO
5111294
Copyright © motifolio.com

**ADN mitocondrial humano ADN mt que muestra la ubicación de varias mutaciones que causan enfermedades mitocondriales.**

## Capitulo 2.MATERIAL Y MÉTODO.

# Material.

**En nuestro estudio se tomaron muestras de sangre mediante punción venosa a 68 pacientes con diferentes grados de varicocele:**

**La clasificación en grados según Dubin-Amelar se divide en 4 grados distintos:**

- **GRADO 0 O SUBCLÍNICO: se corresponde con la presencia de un varicocele en un hombre que sólo puede ser diagnosticado mediante una ecografía, ya sea doppler o testicular normal, o por algún otro medio diagnóstico de imagen.**
- **GRADO 1: grado de varicocele que se corresponde con la presencia de**

un varicocele que sólo es palpable cuando el paciente realiza maniobras de valsalva (maniobras que buscan aumentar la presión intraabdominal, elevando con ello la presión venosa y fomentando la aparición de varicocele)

- GRADO 2: se corresponde con un grado de varicocele en el que el médico es capaz de palpar la presencia de las varices venosas del plexo pampiniforme que definen

al varicocele sin necesidad de que el paciente realice maniobras de Valsalva.

- GRADO 3: grado de varicocele en el que el urólogo o médico de familia que generalmente se enfrenta al diagnóstico de esta enfermedad puede visualizar el varicocele sin la necesidad de la palpación, únicamente mediante la visualización directa.

**Clasificación anatomopatológico tipos y grados de varicocele según las características macro y microscópicas. Para esta idea nos basaremos en los estudio de Nistal-Regadera que clasifican los diferentes grados de varicocele en 3 fundamentales:**

- **Varicocele espermático: es el grado de varicocele que se produce por la formación de varices o acúmulos de**

**sangre venosa en la parte anterior del plexo pampiniforme. Este grado de varicocele suele ser el más frecuentemente encontrado en la práctica clínica habitual y corresponde a grados de Dubin menos avanzados (grados 0,1 y 2). Estos mismo científicos subdividen este grado de varicocele en 2 tipos distintos: varicocele espermático difuso (si la afectación es en todo el**

**plexo anterior pampiniforme y rodea por entero a la totalidad del testículo) y varicocele espermático focal (si únicamente se afectan algunas porciones del plexo anterior pampiniforme, de manera que hay venas dilatadas y venas que no lo están).**

- **Varicocele cremastérico: es el grado de varicocele en el que la lesión se produce en el plexo posterior**

pampiniforme de forma que sólo la cola y la parte posterior del testículo se encuentran afectadas.

- **Varicocele mixto:** es el grado de varicocele en el que encontramos lesiones de los dos tipos anteriores, del plexo anterior y del plexo posterior pampiniforme. Suele aparecer en estadios avanzados de varicocele que se suelen corresponder

**con el grado 3 según la clasificación de Dubin.**

**Todos diagnósticados a través del exámen físico, la flujometria venosa escrotal y seminograma.**

## El seminograma:

**Con alteraciones de las características de los espermatozoides:**

- **Oligoastenozoospermia: afectación del recuento y la movilidad.**
- **Astenoteratozoospermia: afectación de la morfología y la movilidad.**

- **Oligoastenoteratozoospermia: afectación de los tres parámetros, recuento, movilidad, y morfología.**

**Las muestras de semen se obtuvieron de pacientes con varicocele asociado a la infertilidad.Se le realizó a todos el**

**estudio del ADN mitocondrial en los laboratorios de genética y biopsia testicular.**

**MÉTODO.**

**Estudio hemoquímico completo.**

**Estudio genético del ADN mitocondrial.**

**Flujometria venosa escrotal.**

**Seminogramas.**

**Biopsia testicular.**

**Los seminogramas se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones**

**de la OMS (OMS, 1987; WHO, 1992). Las muestras se obtuvieron en recipientes de plástico estériles tras un periodo de abstinencia de tres a cinco días y se consignó el padecimiento de fiebre o la toma de fármacos en los tres meses**

**anteriores. También se anotó la pérdida de alguna porción de la muestra y el tiempo transcurrido antes de su llegada al laboratorio. Se describieron las características de color, olor y consistencia.**

**Tras 30 minutos en una estufa a 37 ºC se midió el volumen (ml) en tubos calibrados, el pH (mediante tiras reactivas) y se practicó el estudio de las variables celulares del seminograma, que incluía el porcentaje de espermatozoides**

**progresivos, la progresión vertical, la concentración de espermatozoides y de células redondas y los porcentajes de gametos vitales y de formas anormales.**

**La determinación del porcentaje de espermatozoides progresivos se llevó**

**a cabo por microscopía óptica de campo claro (400 X) en una gota de semen fresco situada en un portaobjetos y se clasificaron los espermatozoides atendiendo a los criterios OMS. Se consignó el porcentaje de espermatozoides con**

**motilidad progresiva lineal y rápida (a), los que tenían motilidad progresiva, curvilínea y perezosa (b), los que se movían, pero no se desplazaban (c) y finalmente los inmóviles (d). Los espermatozoides pertenecientes a los grupos a y b**

**constituyen el porcentaje de espermatozoides progresivos. Un porcentaje mayor o igual al 50 % de espermatozoides progresivos se considera una muestra con motilidad normal, entre 25 y 49 se toma como astenozoospermia moderada y por**

**debajo de 25 como astenozoospermia severa.**

**La progresión vertical (mm) se determinó midiendo por microscopía óptica el desplazamiento de los espermatozoides (la longitud**

**recorrida por el conjunto de los mejores espermatozoides de la muestra, no de gametos individuales) en un tubo capilar vertical relleno con suero glucosado al 4,8 % tras 30 minutos a 37 ºC.**

**El porcentaje de espermatozoides anormales se determinó en semen fresco. Se consignaron anormalidades en la cabeza (macrocíticos, microcíticos y afilados), de la pieza media y del flagelo (enrollado y doble). También se valoró el número**

**de células redondas en el semen fresco.**

**Estas técnicas fueron adaptadas de las mismas para la determinación de la actividad enzimática en sobrenadante de homogenado muscular enriquecido en mitocondrias**

**(Barroso et al., 1993). Dada la imposibilidad de obtener un sobrenadante de homogenado de espermatozoides enriquecido en mitocondrias para el elevado número de muestras que se pensaba procesar, debido a los requerimientos**

**del estudio (determinación de niveles de mtDNA por célula e identificación del haplogrupo mitocondrial) y al tiempo necesario y dificultades para llevarlo a cabo (Mclean et al., 1993), realizamos el estudio en homogenado total de espermatozoides. Antes**

**llevamos a cabo la validación de la técnica para esta muestra.**

**Nuestra estrategia consistió en una simplificación de una de las hasta ahora utilizadas, consistente en la**

**amplificación de todo el genoma mitocondrial en varios fragmentos y corte con una batería de enzimas de restricción (Torroni et al., 1992). Nosotros seguimos un protocolo jerarquizado, dada la existencia de polimorfismos específicos de los**

**haplogrupos. Una estrategia similar ha sido posteriormente seguida por algunos de los grupos pioneros en el estudio de los haplogrupos mitocondriales (Macaulay et al., 1999).**

## Capitulo 3. ENSAYO CLINICO.

# Daño en el ADN y varicocele.

**La espermatogénesis es un proceso complejo por el cual**

**la célula germinal masculina prolifera y madura a través de meiosis de espermatogonias diploides a haploides espermatozoide. Aunque un pequeño porcentaje de espermatozoides de hombres fértiles posee niveles detectables**

**de daño en el ADN, que puede ocurrir en cualquier paso de espermatogénesis (21, 22), un mayor grado de ADN. La fragmentación está claramente asociada con la infertilidad masculina.**

**Muchos factores, incluidos intra o extratesticulares factores, pueden estar involucrados en este proceso (21, 23). Empaque de cromatina anormal, abortivo apoptosis y producción extrema de oxígeno reactivo especies (ROS) son factores que pueden conducir a Daño en el ADN (24-26). Además,**

**extra testicular factores como la edad, las drogas, el tabaquismo, inflamación del tracto genital, factores hormonales, varicocele, e hipertermia testicular se encuentran entre los razones principales para el daño del ADN (24).**

**Se han utilizado una variedad de métodos para evaluar**
**La integridad de la cromatina espermática y el ADN. Para la evaluación de las principales proteínas asociadas con ADN, los investigadores comúnmente usan cromomicina A3 (CMA3) y tinción con azul de anilina. Desoxinucleotidilo Etiquetado de níquel dUTP mediado por transferasa**

**(TUNEL), el ensayo del cometa, dispersión de cromatina espermática (SCD), naranja de acridina (AO) y esperma**

**El ensayo de estructura de cromatina (SCSA) se utiliza para el ADN.**

**La revisión actual se centra en la relación entre factores testiculares internos involucrados en daño en el ADN y su relación con el varicocele.**

**Se ha propuesto la evaluación del daño en el ADN.**
**como información adicional sobre la calidad del esperma y es un pronosticador del potencial de fertilidad.**
**En el anterior sección, varios factores involucrados en el daño del ADN**
**han sido discutidos. El manejo de la infertilidad**
**los hombres con mayor daño al ADN espermático permanecen alto,**

**particularmente en individuos con varicocele. Algunos los estudios han informado que la fragmentación del ADN espermático ser significativamente mayor en individuos con varicocele en comparación con aquellos con semen normal parámetros (50, 61). Además, daño en el ADN se asocia con la tasa de fertilización espontánea embarazo y resultado del embarazo después de la TAR (62, 63)**

**Es importante confirmar si el varicocele la reparación puede resolver el daño del ADN inducido por varicocele o factores involucrados en el daño del ADN espermático.**

**Muchos estudios sugieren que la reparación del varicocele debería realizarse en hombres infértiles que tienen clínica análisis de varicocele y semen anormal (8, 64).**

**A pesar de este consenso, la cuestión de**

**si el varicocele debe repararse en personas con el daño al ADN sigue siendo controvertido. En una perspectiva juicio, Smit et al. han declarado que el porcentaje del índice de ADN por SCSA se redujo tres meses reparación post-varicocele (14). Además, Azadi et al. (44) y Zini et al. (65) mostraron el efecto beneficioso de la reparación del varicocele en el daño del ADN**

espermático humano.

## Capitulo 4. EVIDENCIAS PRELIMINARES.

**Estudios anteriores no han encontrado una reducción significativa en el daño del ADN tres meses después del varicocele ya**

**reparado.**

**Proponen que la duración del espermatogénico**

**el ciclo es de aproximadamente 64 días, por lo tanto, la reducción de la fragmentación del ADN debe evaluarse seis meses después de la reparación del varicocele. Considerando esta descripción general de los trabajos de investigación,**
**Sugerimos que se realice la reparación del varicocele en**

**individuos con varicocele que tienen alta fragmentación de ADN en sus muestras de semen antes de la cirugía.**

## CAPITULO 5. DESARROLLO Y DISCUSIÓN.

**El varicocele se considera una de las principales etiologías de la infertilidad masculina. Junto con parámetros alterado del semen, se cree que el aumento de la fragmentación del ADN juega un papel importante en la inducción de varicocele en la esterilidad. El daño del ADN puede resultar de factores intra o extra testiculares. Entre**

**estos, la apoptosis,el empaque anormal de cromatina y el estrés oxidativo son los más investigados . Evidencia significativa sugiere que los varicoceles tienen un efecto nocivo en la función de los testículos y una varicocelectomía no solo previenen la disminución progresiva de la función testicular, sino también revierte el daño. Sin embargo, el grado en que la reparación del varicocele mejora las tasas de embarazo y el éxito de la**

**tecnología de reproducción asistida (ART) sigue siendo controvertido. También se discute la reparación del varicocele en la fragmentación del ADN. ( Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D. y Marziyeh Tavalaee, M.Sc.)**

**El varicocele se diagnosticó mediante la palpación del cordón espermático con el paciente de pie, tumbado y durante la**

**maniobra de Valsalva. El reflujo de sangre venosa se confirmó mediante una ecografía Doppler dúplex (Toshyba Nemio SSA-550A Diagnostic Ultrasound System). Los sujetos fueron incluidos para la realización de una varicocelectomía mediante la técnica subinguinal microquirúrgica, ligando**

**todas las venas dilatadas, conservando las arterias y glándulas linfáticas. Simultáneamente, se hizo una biopsia testicular (TESE) homolateral para la obtención de una muestra para anatomía patológica y el análisis de FADN en espermatozoides intratesticulares.**

## Análisis de la fragmentación del ADN

**La FAD se realizó en muestras frescas de semen previo a la cirugía y testiculares obtenidas por extracción de espermatozoides del testículo, mediante el test de dispersión de la cromatina descrito por Fernández et al en 2003[14].**

**Se trata de un método de desnaturalización y lisis de las proteínas nucleares, basado en el principio de que los espermatozoides cuyo ADN está intacto producirán un halo de dispersión que corresponde a la cromatina liberada de proteínas, pudiendo ser fácilmente analizado por microscopía óptica de**

**fluorescencia. Para ello, utilizamos el kit comercial Halosperm® de Halotech Dna15. Valores de hasta el 27 ± 11% en el índice FADN se suelen considerar dentro de la normalidad en varones fértiles y normozoospérmicos. La muestra de semen se recolectó por masturbación tras 2-3 días de**

**abstinencia. Las muestras frescas se procesaron siguiendo el protocolo que se describe en el kit Halosperm®. En testículo, extrajimos los espermatozoides de pequeñas cantidades del tejido biopsiado. Para ello, presionamos varias veces sobre la muestra utilizando unas pinzas, y**

**resuspendimos con una pipeta de 1 ml. Retiramos el tejido y centrifugamos a 600 g durante 5 minutos. Desechamos el sobrenadante y resuspendimos en 50 µl de *buffer* fosfato salino estéril. Tomamos 10 µl y observamos la presencia de espermatozoides al microscopio. A partir**

**de este punto, seguimos el protocolo descrito anteriormente.**

**-En los 68 pacientes nos guiamos de su origen materno afroamericano siguiendo los criterios establecidos de la *Organización Mundial de la Salud* y a**

**diferentes investigaciones que muestran disparidades raciales en el análisis del semen.**

**-Estudiamos a individuos en edades comprendida entre los 25 a 35 años de edad.**

**-Las exclusiones fueron, la raza o etnia no declarada, cirugía testicular, anomalías cromosómicas, ausencia de conductos deferentes, consumo**

**previo de testosterona o tratamientos previos de quimioterapia o radioterapia.**

**-El ADN mitocondrial estudiado en estos grupos de humanos se observó que el polimorfismos de nucleótidos simple mitocondriales que se han ido acumulando en los individuos durante la evolución y que persisten en las poblaciones en la forma de diferentes**

**haplotipos y podrían jugar un rol en la susceptibilidad genética de la población masculina a la infertilidad.**

**-La función testicular afectada por el varicocele la observamos en la espermatogénesis de todos los casos estudiados.**

**El hallazgo más común en los análisis de semen fue el aumento de las formas patológicas de espermatozoides, la disminución de la motilidad y la disminución en la densidad del semen.**

**-La biopsia de testículo en los 68 pacientes con varicocele se le relizó**

**y en todas las muestras se observó diferentes anormalidades.**

**El hallazgo más común se observó en la disfunción de las células de Leydig en 8 de los casos, el descenso del número de espermatogonias en 54 pacientes y edema del epitelio germinal en 6 de los pacientes.**

**- Las causas masculinas de infertilidad en todos los casos, fue en primer lugar la astenospermia seguida de la oligospermia, las alteraciones más frecuentes encontradas en el espermiograma. En 68 de los hombres se encontró causa de infertilidad, ya sea por el resultado de dos o más espermiograma consecutivos o por el hallazgo de**

**varicocele.**

**-Según el análisis del semen las principales alteraciones encontradas fueron la astenospermia en 50 pacientes y oligospermia en 18 de los pacientes, siendo la astenospermia las más frecuentes y se asoció al diagnóstico de varicocele.**

**-Para la infertilidad masculina la prevalencia de ADN mitocondrial de riesgo en hombres infértiles fue significativamente mayor.**

**El ADN mitocondrial con alteraciones disminuyó la motilidad de los espermatozoides y la tasa de morfología normal. Además, se confirma el impacto en la infertilidad**

**masculina.**

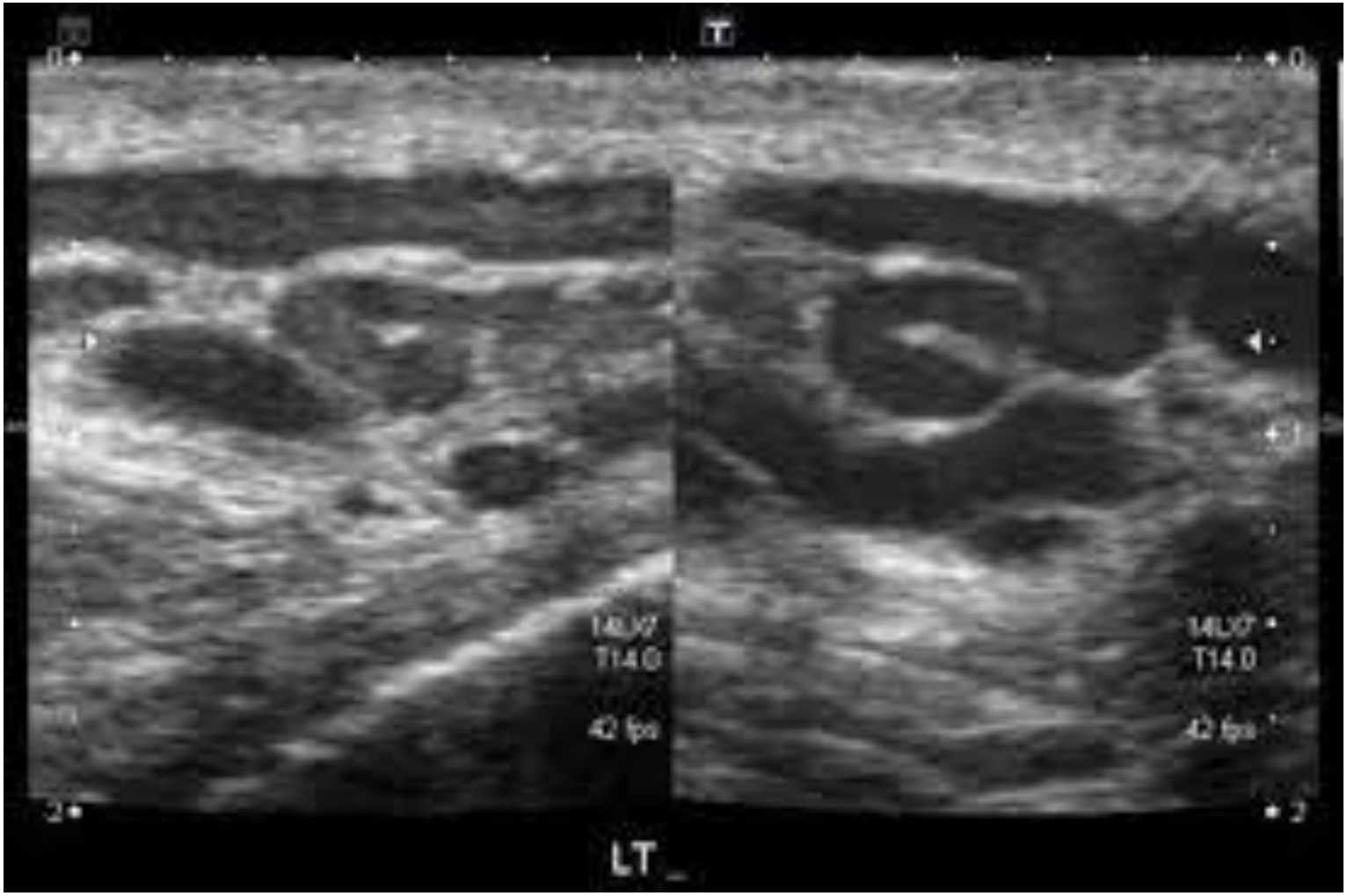
**- La ecografía:**

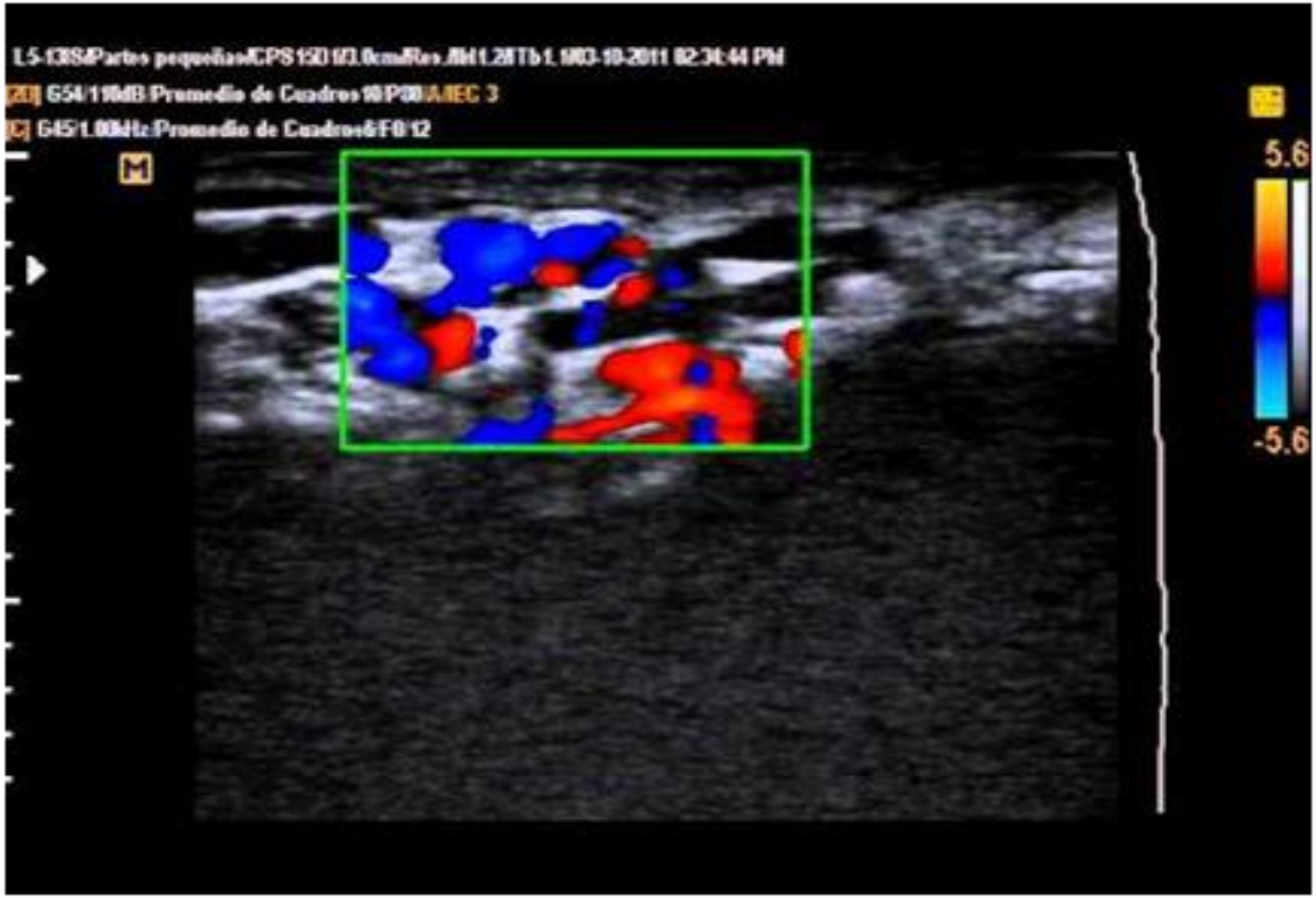
**Fue el método más usado para el diagnóstico imagenológico, pero no proporciona una evaluación**

**cuantitativa.**

**La aparición del Eco-doppler color nos permitió determinar y medir tanto la dirección como la velocidad de caudal sanguíneo.**
**El testículo lo observamos con gran detalle mediante esta técnica.**

**La conservación de las imágenes obtenidas nos permitió un seguimiento comparativo con las que realizamos después del tratamiento.**


T
T14.0
42 fps
T14.0
42 fps
LT


5.6
-5.6

## CONCLUSIONES.

**En los 68 pacientes con diferentes grados de varicocele:**

**-Se confirmó la asociación entre el ADN mitocondrial y la motilidad espermática.**

**-LA ASTENOZOOSPERMIA fué la base que se**

**relacionó con el ADN mitocondrial subyacente.**

**-FUE EL CONJUNTO DEL HAPLOGRUPO, Y NO UNA RAMA PARTICULAR, EL ASOCIADO A LA ASTENOZOOSPERMIA MODERADA.**

**-LA DISTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES SE CONSIDERÓ REPRESENTATIVA DE LA POBLACIÓN GENERAL.**

**-EL FENOTIPO BIOQUÍMICO QUE ASOCIA LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA AL FONDO GENÉTICO**

**MITOCONDRIAL ES LA FUNCIÓN RESPIRATORIA.**

**RECOMENDACIONES.**

**-Sugerimos que se realice la reparación del varicocele en individuos con varicocele que tienen alta fragmentación de ADN**

**mitocondrial asociado a la infertilidad masculina en sus muestras de semen antes de la cirugía.**

**- Se recomienda un control anual con ultrasonidos del volumen testicular, ya que es el método más preciso y reproducible para medir las**

**variaciones en el tamaño del testículo.**
**Variaciones de más de 2 ml o del 20% del**
**volumen por ecografía es actualmente el mejor indicador de daño testicular**

## BIBLIOGRAFÍAS Y ANEXOS.

**1-Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, and Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. Hum Reprod 1993; 8: 1863-1868.**

**2-Ford WCL and Harrison A. The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1981; 63:**

**271-278.**

**3-Ford WCL, Whittington K, and Williams AC. Reactive oxygen species in human suspensions: Production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. Int J Androl 1997; 20: 44-49.**

**4-Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: Mitochondrial mutations and**

**degeneration of the optic nerve. Vision Res 1997; 37: 3495-3507.**

**5-Howell N, Bogolin C, Jamieson R, Marenda DR, and Mackey DA. mtDNA mutations that cause optic neuropathy: How do we know? Am J Hum Genet 1998; 62: 196-202.**

**6-Howell N. Human mitochondrial diseases: Answering questions and**

**questioning answers. Int Rev Cytol 1999; 186: 49-116.**

**7-Howell N and Bogolin Semejkal C. Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: Hypermutacion as an apparent consequence of simple-repeat expansion / contraction. Am J Hum Genet 2000; 66: 1589-1598.**

**8-Hrudka F. Cytochemical demonstration of cytochrome oxidase - an objective vitality test of spermatozoa. Dev Growth Differ 1986; 28: 89.**

**9-Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. Int J Androl 1987; 10: 809-828.**

**10-Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, and Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. Urology 1995; 46: 545-549.**

**11-Hu G and Thilly WG. Multi-copy nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA reveal recent acute genetic changes in the human genome. Curr**

**Genet 1995; 28: 410-414.**

**12-Huizinga HA, Korver S, McDaniel BT, and Politiek RD. Maternal effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproduction traits. Livest Prod Sci 1986; 15: 11-26.**

**13-Huszar G, Vigue L, and Corrales M. Sperm creatine kinase activity in fertile**

**and infertile oligospermic men. J Androl 1990; 11: 40-46.**

**14-Huszar G, Vigue L, and Morshedi M. Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: A blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. Fertil Steril 1992; 57: 882-888.**

**15-Huszar G and Vigue L. Imcomplete**

**development of human spermatozoa is associated with creatine phophokinasee concentration and abnormal head morphology. Mol Reprod Dev 1993; 34: 292-298.**

**16-Huszar G and Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J Androl 1994; 15: 71-77.**

**17-Huszar G, Patrizio P, Vigue L, Willets M, Wilker C, Adhoot D, and Johnson L. Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. J Androl 1998; 19: 11-20.**

**18-Hutchin T and Cortopassi G.**

**Mitochondrial DNA haplotype predicts deafness risk. Am J Med Genet 1994; 55: 1-8.**

**19-Ianello RC, Young J, Sumarsono S, Tymms M, and Kola I. A model for understanding gene regulation during spermatogenesis: The mouse testis Pdha-2 promoter. Reprod Fertil Dev 1995; 7: 705-712.**

**20-Iida T and Kobayashi S. Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in Drosophila embryos. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11274-11278.**

**21-Ikeda S and Ozaki K. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). Biochem Biophys Res Commun 1997;**

**235: 291-294.**

**22-Iñiguez C, Arenas J, Montoya J, Mostacero E, López del Val J, and Morales F. El déficit en la cadena respiratoria mitocondrial se puede presentar como una esclerosis múltiple. Neurología 1998; 13: 199-203.**

**23-Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Hum Reprod 1998; 13:**

**33-44.**

**24-Iwasaki A and Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57: 409-416.**

**25-Izaguirre N and de la Rúa C. An mtDNA analysis in ancient basque populations: Implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic**

**expansion from southwestern europe. Am J Hum Genet 1999; 65:199-207.**

**26-Jacobs HT. Structural similarities between a mitochondrially encoded polypeptide and a family of prokaryotic respiratory toxins involved in plasmid maintenance suggest a novel mechanism for the evolutionary maintenance of mitochondrial DNA. J Mol Evo 1991; 32: 333-339.**

**27-Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Pongratz DE, Müller-Höcker J, Jedele KB, Meitinger T, and Gerbitz KD. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA Ser (UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. J Med Genet 1998; 35: 895-900.**

**28-James AM, Sheard PW, Wei YH, and Murphy MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. Implications for neurodegenerative and mitochondrial DNA diseases. Eur J Biochem 1999; 259: 462-469.**

**29-Jansen RPS and de Boer K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. Mol Cell Endocrinol 1998; 145: 81-88.**

**30-Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, and Gyllesten U. Mitochondrial mutation rate revisited: Hot spots and polymorphism. Nat Genet 1998; 18: 109-110.**

**31-Konstantinov YM, Lutsenko GN, and Podsosonny VA. Genetic functions of isolated maize mitochondria under model changes of redox conditions. Biochem Mol Biol Int 1995; 36: 319-326.**

**32-Krakauer DC and Mira A. Mitochondria and germ-cell death. Nature 1999; 400: 125-126.**

**33-Krakauer DC and Mira A. Reply to**

**Perez GI. Nature 2000; 403: 501.**

**34-Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, Ericsson SA, and Prins GS. Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. J Androl 1993; 14: 374-384.**

**35-Krause W. Contribution of**

**andrological factors to sterility. Andrologia 1996; 28: 15-17.**

**36-Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, and Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: Relationship with motility and fertilization in vitro. Fertil Steril 1994; 62: 599-605.**

**37-Krings M, Stone A, Schmitz RN, Krainitzki N, Stoneking M, and Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. Cell 1997; 90: 19-30.**

**38-Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, and Pääbo S. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. Proc Natl Acad Sci 1999 a; 96: 5581-**

**5585.**

**39-Krings M, Salem AH, Bauer K, Geisert H, Malek AK, Chaix L, Simon C, Welsby D, Di Rienzo A, Utermann G, Sajantila A, Pääbo S, and Stoneking M mtDNA analysis of nile river valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration?. Am J Hum Genet 1999 b; 64: 1166-1176.**

**40-Krzyzosiak J, Molan P, and Vishwanath R. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. Anim Reprod Sci 1999; 55: 163-173.**

**41-Ku CY, Lu Q, Ussuf KK, Weinstock GM, and Sanborn BM. Hormonal regulation of cytochrome oxidase subunit messenger RNAs in rat Sertoli cells. Mol Endocrinol 1991; 5: 1669-1676.**

**42-Kullikauskas V, Blaustein D, and Ablin R. Cigarette smoking and its possible effects on sperm. Fertil Steril 1985; 44: 526-528.**

**43-Lamminen T, Huoponen K, Sistonen P, Juvonen V, Lahermo P, Aula P, Nikoskelainen E, and Savontaus ML. mtDNA haplotype analysis in finnish families with Leber hereditary optic**

**neuroretinopathy. Eur J Hum Genet 1997; 5: 271-279.**

**44-Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, and Gray MW. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 1997; 387: 493-497.**

**45-Lapeña AC. Haplogrupos del mtDNA y**

**astenozoospermia humana. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 1999.**

**46-Larsson NG and Clayton DA. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. Annu Rev Biochem 1995; 22: 151-178.**

**47-Larsson NG, Oldfors A, Garman JD, Barsh GS, and Clayton DA. Down-**

**regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. Hum Mol Genet 1997; 6: 185-191.**

**48-Lestienne P, Reynier P, Chrétien MF, Penisson-Besnier I, Malthièry Y, and Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. Mol Hum Reprod 1997; 3: 811-814.**

**49-Leuzzi V, Carducci Ca, Lanza M, Salvetti M, Rostori G, Di Giovanni S, and Torroni A. LHON mutations in italian patients affected by multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1997; 96: 145-148.**

**50-Lezza AMS, Boffoli D, Scaccoo S, Cantatore P, and Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977 bp deletion and respiratory chain**

**enzyme activities in aging human skeletal muscles. Biochem Biophys Res Commun 1994; 205: 772-779.**

**51-Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, and Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. Trends Genet 1997; 13: 450-455.**

**52-Liu DY and Baker HWG. Tests of**

**human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 465-483.**

**53-Loft S, Astrup A, Buemann B, and Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. FASEB J 1994; 8: 534-537.**

**54-Playán-Ariso AM. Diagnóstico molecular de enfermedades del DNA mitocondrial. Tesis doctoral. Facultad de**

**Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 1999.**

**55-Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JKV, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, and Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nat Genet 1998; 20: 291-293.**

**56-Pollak JK and Sutton R. The**

**differentiation of animal mitochondria during development. Trends Biochem Sci 1980; X: 23-27.**

**57-Poulton J. Transmission of mtDNA: Cracks in the bottleneck. Am J Hum Genet 1995; 57: 224-226.**

**58-Poulton J and Marchington DR. Prospects for DNA-based prenatal diagnosis of mitochondrial disorders.**

**Prenatal Diag 1996; 16: 1247-1256.**

**59-Poulton J, Macaulay V, and Marchington DR. Is the bottleneck cracked?. Am J Hum Genet 1998 a; 62: 752-757.**

**60-Poulton J and Marchington D. Reply to Chinnery et al. Am J Hum Genet 1998 b; 63: 1910-1911.**

**61-Poyton RO and McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. Annu Rev Biochem 1996; 65: 563-607.**

**62-Prades A, Calafell F, Budowle B, Bertranpetit J, and Martínez-Jarreta B. Sequence analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) control region in Aragon (North Spain). An anthropological view. Progress Forensic Genet, 1999.**

**63-Premkumar E and Bhargava PM. Transcription and translation in bovine spermatozoa. Nature 1972; 240:139-143.**

**64-Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nat Genet 1993; 4: 289-294.**

**65-Przyrembel H. Therapy of mitochondrial disorders. J Inher Metab Dis 1987; 10: 129-146.**

**66-Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K, and Santachiara-Benerecetti AS. Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. Nat Genet 1999; 23: 437**

**441.**

**67-Race HL, Herrmann RG, and Martin W. Why have organelles retained genomes?. Trends Genet 1999; 15: 364-370.**

**68-Rando JC, Pinto F, González AM, Hernández M, Larruga JM, Cabrera VM, and Bandelt HJ. Mitochondrial DNA analysis of northwest african popultions reveals genetic exchanges with**

**european, near-eastern, and sub-saharan populations. Ann Hum Genet 1998; 62:531-550.**

**69-Rao B, Soufir JC, Martin M, and David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 1997; 24:127-134.**

**70-Reid FM, Vernham GA, and Jacobs**

**HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. Hum Mutat 1994; 3: 243-247.**

**71-Reid FM, Rovio A, Holt IJ, and Jacobs HT. Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation. Hum Mol Genet 1997; 6: 443-449.**

**72-Reynier P, Chrétien MF, Savagner F, Larcher G, Rohmer V, Barrière P, and Malthièry Y. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252: 373-377.**

**73-Reynier P, Penisson-Besnier I, Moreau C, Savagner F, Vielle B, Emile J, Dubas F, and Malthièry Y. mtDNA haplogroup J: A contributing factor of optic neuritis. Eur J Hum Genet 1999; 7: 404-406.**

**74-Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A, Papiha S, Hedges R, Bandelt HJ, and Sykes B. Paleolithic and neolithic lineages in the european**

**mitochondrial gene pool. Am J Hum Genet 1996; 59: 185-203.**

**75-Tulloch WS. A consideration of sterility factors in the light of subsequent pregnancies: Subfertility in the male. Trans. Edinburgh Obstet. Soc 59:29, 1952**

**76- MacLeod J. Seminal cytology in the**

**presence of varicocele. Fertil Steril 1965; 16:735.**

**77- Brown JS. The varicocele as related to fertility .Fertil Steril 18:46, 1967**

**78- Dubin L and Amelar RD. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. Urology 10:446, 1977**

**79- Braedel HU et al. A posible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele (University of Saarland, Germany). J. Urol 1994; 151:62-66.**

**80- Kondoh N. et al. Significance of subclinical varicocele detected by scrotal sonography in male infertility: a preliminary report (University Osaka, Japon). J. Urol 1993;1158-1160.**

**81- Dennison, A.R.; Tibbs, D.J.: "Varicocele and varicose veins compared. A basis for logical surgery". Urology, 28: 211, 1986.**

**82- Braedel, H.U.; Steffens, J.; Ziegler, M. y cols.: "A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele". J. Urol., 151: 62, 1994.**

**83- Shafik, A.; Moftah, A.; Olfat, S. y**

**cols.: “Testicular veins: anatomy and the role in varicocelogenesis and other pathologic conditions”. Urology, 35: 175, 1990.**

**84- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaría L. Obstruction of the tubuli recti and ducti efferents by dilated veins in the testis of men with varicocele and its possible role in causing atrophy of the seminiferous tubules. Int J Androl 1984;**

**7: 309-323.**

**85- Nistal M, Redondo E. Varicocele, histología y etiopatogenia. En: III Congreso Nacional de Andrología. Zaragoza: ASESA; 1987. 59-92.**

**86- Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: Cortisol and cathecholamines. Fertil Steril 1974; 25: 88-95.**

**87- Glezerman M, Rakowszczyk M, Lunderfeld B, Been R, Goldman B. Varicocele in oligospermic patients: pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein. J Urol 1976; 115: 562-565.**

**88- Terquem A, Dadoune JP. Morphological findings in varicocele: an**

**ultrastructural study of 30 bilateral testicular biopsies. Int J Androl 1981; 4: 515-531.**

**89- Comhaire F, Simons M, Kunnen M, Vermeulen L. Testicular arterial perfusion in varicocele: the role of rapid sequence scintigraphy with technetium in varicocele evaluation. J Urol 1983; 130: 923-926.**

**90-Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwaser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. Fertil Steril 1995; 63: 120-124.**

**91- Hargreave TB. Varicocele: overview and commentary on the results of the World Health Organisation varicocele trial. En: Waites GMH, Frick J, Baker GWH. Current advances in andrology.**

**Proceedings of the V th International congress of Andrology. Monduzzi, Bologne, 31-34.**

**92- Rageth JC, Unger C, DaRunga D. Long-term results of varicocelectomy. Urol Int 1992; 48: 327-331.**

**93- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II**

**Pathophysiology of varicocele in male infertility. Hum Reprod Update 2001;7:473-81**

**94- Sikka SC: Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1996; 1:e78–e86.**

**95-Kodama H, Ymaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T: Increased oxidative**

**deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997; 68: 519–524.**

**96- Saleh RA, Agarwal A: Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. J Androl 2002; 23: 737–752.**

- **ANEXOS.**

**MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR**

**DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN DE POSTGRADO.**

**Solicitud de Aspirantura de la ACC**

1. Título del Tema: APLICACIÓN DE LA GENETICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

2. Modalidad: Tiempo Parcial.
3. programa o problema de la ciencia y técnica al que pertenece al tema
   PROGRAMA NACIONAL N0. 3 ENFERMEDADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES.

4. Nombre del Propuesto:.MAURICIO MARTI BRENES

   a) Categoría Docente Otorgada: Profesor Asistente de UROLOGÍA PROFESOR PRINCIPAL DE LA ASIGNATURA.
   b) Categoría Científica: Edad: Fecha de Nacimiento. Edad. 48 años Fecha d e nacimiento 31. 10. 1955

   c) Centro de Trabajo: Facultad de Ciencias Dr. Miguel Enríquez.
   Dirección: Ramón Pinto No. 202 entre Ensenada y Villanueva. Luyano, Ciudad de la Habana.
   Teléfono: 98'8543. 99'4847

5. Cargo que ocupa y breve descripción de la labor que realiza:

**Cargos:**

- VICEDECANO DOCENTE de la Facultad de Ciencias Médicas. DR. Miguel Enríquez.
- Especialista de Primer Grado en Urología.
- Profesor Asistente de Urología
- Miembro Titular de la Sociedad Cubana de Urología

AI DUAL CAMERA

***MINISTERIO DE SALUD PUBLICA***
***DIRECCIÓN DE RELACIONES INTERNACIONALES***

*Ciudad de La Habana, 16 de agosto del 2005.*

*A la Honorable Embajada de España :*

*El Ministerio de Salud Pública a través de su Dirección de Relaciones Internacionales, solicita visa de estancia por 90 dias a favor del viajero:* ***MAURICIO MARTI BRENES, Pasaporte Ordinario No. c690188.***

*Viaja a España el 15 de septiembre del presente año a:* ***TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS, ABORDAR PARTE EXPERIMENTAL DEL PLAN DE TRABAJO.***

***Itinerario:*** *Habana / Zaragoza / Habana*

***Nota:*** *La parte que invita correrá con los gastos del viaje .*

*Aprovecho la oportunidad para expresarle el testimonio de mi más alta y distinguida consideración y estima.*

*Dr. Raúl Gómez González*
*Jefe Departamento de Trámites y Protocolo*

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
SALUS POPULI SUPREMA LEX
Relaciones Internacionales

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular
Miguel Servet 177
50013 Zaragoza
Spain
Telephon 34-76-761642
Fax 34-76-761612
e-mail: lopezper@posta.unizar.es

Manuel J. López-Pérez

31 de julio de 2005

Estimado Dr. Martí,

En relación con la colaboración que mantenemos entre su grupo de investigación y el nuestro, sería muy interesante para el desarrollo del mismo que Vd. pudiera desplazarse a Zaragoza para que pudiéramos abordar la parte experimental del plan de trabajo. Los gastos de desplazamiento y estancia correrían de nuestra parte, al igual que el seguro médico que será tramitado por nuestro país. Entiendo que dado el trabajo previsto exige analizar las secuencias de muchas muestras, el plan previsto solo sería realizable en un periodo de al menos dos meses.

Para ello le ruego reciba mi invitación a realizar una estancia en este Departamento desde principios de septiembre hasta finales de Octubre, fechas en las que el laboratorio está más disponible de espacio. De esta forma la tesis podría ser finalizada para su presentación final a su vuelta a La Habana. Las fechas concretas dependerán de las disponibilidades de pasajes.

Atentamente

Manuel J. López Pérez

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular
Miguel Servet 177
50013 Zaragoza
Spain
Telephon 34-76-761642
Fax 34-76-761612
e-mail: lopezper@posta.unizar.es

Manuel J. López-Pérez

Manuel José López Pérez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza, emite el siguiente Informe sobre la estancia realizada por el Dr. D. Mauricio Martí Brenes en su laboratorio:

El Dr. Martí ha realizado una estancia de trabajo experimental en mi laboratorio de la Universidad de Zaragoza desde el 9 de Octubre al 8 de Noviembre de 2004. Durante la misma ha realizado las técnicas de extracción y aislamiento de DNA a partir de diferentes muestras biológicas, y más en particular de muestras de sangre. Además, hemos estado discutiendo las líneas de desarrollo de un proyecto de investigación a realizar en colaboración entre ambos y que sustentaría el desarrollo de su tesis doctoral.

El proyecto a desarrollar consistiría básicamente en estudiar variantes mutacionales del DNA mitocondrial que pueden afectar a la motilidad espermática, en una población cubana control y que ha estado afectada de varicocele. En nuestro laboratorio, hemos comprobado que variantes poblacionales caucásicos del DNA mitocondrial presentan una motilidad espermática menor. En particular, el haplogrupo T, y los subhaplogrupos U4, U1811 y U5 A1, están concentrados en individuos astenozoospérmicos. El objetivo del proyecto planteado pretende estudiar si variantes genéticos de este tipo, u otros que puedan estar presentes en población cubana con línea materna afroamericana, (y por consiguiente, con otros tipos de variantes) podían favorecer la astenozoospermia asociada al varicocele.

La línea de colaboración planteada y mencionada anteriormente resulta del mayor interés para este laboratorio, y puede aportar nuevas evidencias de una predisposición genética poblacional relacionada con el DNA mitocondrial para una astenozoospermia.

Zaragoza a 4 de Noviembre de 2004

Fdo. Manuel José López Pérez

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR
FACULTAD DE VETERINARIA

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

**Ministerio de Salud Pública**
**Dirección Jurídica**

23 entre N y O, Edificio Soto, Vedado
Ciudad de la Habana, C.P.10400
Cuba

LIC. TANIA MARIA GARCIA CABELLO, DIRECTORA JURIDICA DEL MINISTERIO DE SALUD PUBLICA DE LA REPUBLICA DE CUBA, POR LA PRESENTE,----------

CERTIFICO: Que el Dr. MAURICIO MARTÍ BRENES

Docente y Profesor Principal de Urologia, de dicha Facultad; señalándose que en enero de 2004 obtiene la categoría docente de Profesor Asistente y; en enero de 2005, con la presentación y publicación del trabajo "Infertilidad masculina a partir del ADN mitocondrial en pacientes con varicocele"

Y para que así lo pueda acreditar donde corresponda y surta efecto fuera del territorio nacional, expido la presente a los 28 días del mes de julio del año 2008.----------

Dr. Nicolás Fernández Montoto, Lda. María de los Angeles Montalvo Carrió, Lda. Tania M. García Cabello, Asesores Jurídicos del Ministerio de Salud Pública, por la presente:

CERTIFICO: Que la firma del funcionario que antecede es autentica por la semejanza que guarda con la que acostumbra a usar en sus actos oficiales

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de julio del 2008

Números de teléfono: (537) 55 3335, (537) 55 3373

**DRA. ANA GLORIA SOSA CÁCERES**
**SECRETARIA GENERAL**
**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA**

Dpto. Archivo, Títulos y Certificaciones Secretaría General

***CERTIFICO QUE:*** Según antecedentes que obran en el expediente, de Post-Grado, perteneciente al Doctor **MAURICIO MARTI BRENES.**

Folio: 214 2-3

Y a solicitud de la CONSULTORIA JURÍDICA INTERNACIONAL, a los efectos de utilizarla fuera del Territorio Nacional, autorizada con el Sello Oficial del Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, se expide la presente en Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los diez días del mes de julio del año dos mil ocho.....

Dr. Nicolás Fernández Montoto, Lda. María de los Angeles Montalvo Carrió, Lda. Tania M. García Cabello, Asesores Jurídicos del Ministerio de Salud Pública, por la presente:

CERTIFICO: Que la firma del funcionario que antecede es auténtica por la semejanza que guarda con la de acostumbra a usar en sus actos oficiales

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de julio del 2008

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
SALUS POPULI SUPREMA LEX
DIRECCIÓN JURÍDICA

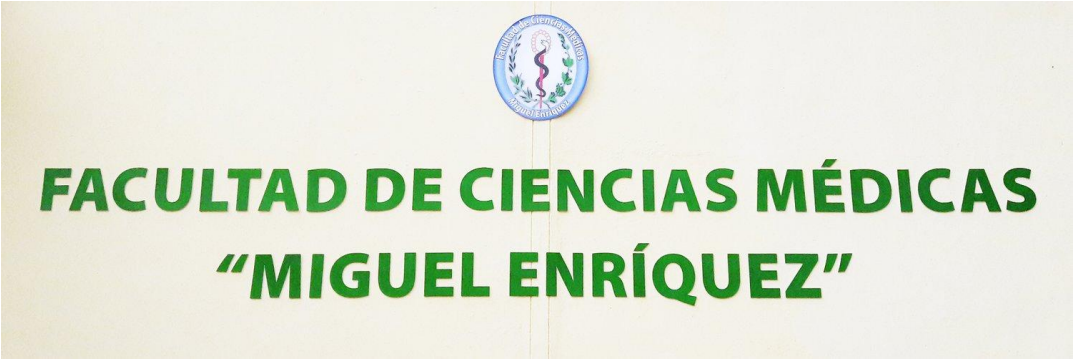
La Habana, 31 JUL 2008
Antonio Marinas Trillo
Canciller

Visto en este Consulado General de España en La Habana la firma de ... a la fecha del documento, por ser el parecer auténtica.

30860

REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN DE ASUNTOS CONSULARES Y DE CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR
LA HABANA: 29 JUL. 2008
FUNCIONARIO AUTORIZADO PARA CERTIFICAR AUTENTICIDADES DE FIRMA EN DOCUMENTOS EXPEDIDOS PARA SURTIR EFECTOS EN EL EXTRANJERO.
CERTIFICO QUE EL PRECEDE ES AUTÉNTICA DEL FUNCIONARIO ANTECEDENTE EN ESTE DOCUMENTO, LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR SEMEJANZA QUE GUARDA CON LA QUE OBRA REGISTRADA EN ESTE CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A USAR EN SUS ACTOS OFICIALES. EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE FINANZAS Y PRECIOS
20 VEINTE PESOS
ONAT
ESPECIES TIMBRADAS




**UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES.**

# Mitochondrial DNA related to varicocele infertility.

**Thesis to qualify for the scientific degree of Doctor of Medical Sciences.**

**Dr. Mauricio Martí Brenes.**

**Tutors:**

**Prof. Dr. C. Manuel Lopez Perez (Spain),**

**Prof. Dr. C. Julio César Morales Concepción (Cuba).**

**2005**

## Dedication.

**To my parents.**
**To my wife.**
**To my children.**

## THANKS

**To my family, without your help, nothing in my life would have been possible.**
**To my tutors.**
**To my patients.**

**INTRODUCTION.**

**CHAPTER 1. THEORETICAL FRAMEWORK.**

**CHAPTER 2. MATERIAL AND METHOD.**

**CHAPTER 3. CLINICAL TRIAL.**

**CHAPTER 4. PRELIMINARY EVIDENCE.**

**CHAPTER 5. DEVELOPMENT AND DISCUSSION.**

**CONCLUSIONS.**

**RECOMMENDATIONS.**

**BIBLIOGRAPHIES AND ANNEXES.**

## Summary.

**The revision current I know center in the relation between factors testicular internal involved in damage in the DNA Y its relationship with the varicocele. Varicocele is considered one of the main etiologies of male infertility. Along with altered semen**

**parameters, increased DNA fragmentation is thought to play an important role in the induction of varicocele in infertility. The damage of DNA can result of factors inside or extratesticular. Among these, apoptosis, abnormal chromatin packing and oxidative stress are the most investigated.**

**Significant evidence suggests that varicoceles have a deleterious effect on testicular function, and a varicocelectomy not only prevents the progressive decline in testicular function , but also reverses the damage. Without embargo, the degree in that the repair of varicocele improves**

**pregnancy rates and the success of assisted reproductive technology (ART) remains controversial.**

**Varicocele repair in DNA fragmentation is also discussed . (Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D. and Marziyeh Tavalaee, M.Sc.)**

## Chapter 1. THEORETICAL FRAMEWORK.

**Diseases associated with mitochondrial DNA.**

**They are disorders resulting from the deficiency of one or more proteins located in the mitochondria and involved in metabolism. Some 150 mutations have been described that end up in different types of diseases.**

**-Mitochondrial dysfunction is considered a common pathway in a series of diseases, both acute and chronic, due to the phenomenon of oxidative stress and the generation of the systemic inflammatory response.**

**-Mitochondrial DNA depletion syndrome. Mitochondrial DNA Depletion Syndrome (MDS) refers to a group of autosomal**

**recessive diseases that cause significant wear and tear of mitochondrial DNA in affected tissues. Most of the genetic material is found on chromosomes inside the cell nucleus, but mitochondria, organelles inside cells that produce energy used in metabolism, also contain a small amount of DNA called mitochondrial DNA. . Mitochondrial DNA (mtDNA) is found outside of a cell's chromosomes, in the**

**mitochondria. mtDNA is only inherited from the mother. So all the children of a woman have the same mtDNA. The children of the daughters of this woman also have the same mtDNA and so on.**

**Mitochondrial DNA (mtDNA) or mitochondrial genome is a genetic material of the mitochondria, the elements of the cell that generate energy for it. It is a double-stranded**

**closed circular genetic material that is located inside the cell mitochondria.**

**Mitochondria are cellular organelles that perform essential functions for cell physiology. Mitochondrial dysfunction can be caused by mutations in mitochondrial (mtDNA) or nuclear (nDNA) DNA or by other causes that secondarily affect mitochondrial metabolism.**

**There are many conditions caused by the malfunction of the mitochondria and they are called “mitochondrial diseases”.**

**The common factor between these diseases is that the mitochondria are unable to generate enough energy for the cells to function properly.**

**-Leigh syndrome or subacute necrotizing encephalomyelopathy is a progressive**

**neurological disease defined by the specific neuropathological characteristics associated with lesions of the brainstem and basal ganglia. Its prevalence at birth has been estimated at 1/36,000.**

**MELAS syndrome (myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like events) is a progressive neurodegenerative disorder**

**characterized by acute neurological events comparable to stroke, associated with hyperlactatemia and mitochondrial myopathy.**

**MATERNAL OR MITOCHONDRIAL INHERITANCE.**

**This is because the mitochondria do not pass from the sperm to the oocyte at fertilization, which is why it is also called maternal inheritance, although there are also nuclear genes that are also inherited through the maternal line.**

**-Leber's hereditary optic neuropathy**

**(LHON) or Leber's optic atrophy is a degeneration of the retinal ganglion cells and their axons, inherited mitochondrially (from the mother to all her children), which leads to an acute or subacute loss of central vision . This predominantly affects young adult males. Nuclear DNA and mitochondrial DNA are different in many ways; input, by location and structure. Nuclear DNA is found within the nucleus of eukaryotic cells**

**and has two copies per cell.**
**Mitochondrial DNA is located in the mitochondria and contains 100-1000 copies per cell.**
**They are transcribed by a specific mitochondrial RNA polymerase.**
**Ribonucleic acid (RNA or RNA) is a nucleic acid made up of a chain of ribonucleotides. It is present in both prokaryotic and eukaryotic cells, and is the only genetic material of certain**

**viruses (RNA viruses).**

**-Lynch syndrome or hereditary non-polyposis colorectal cancer, in English HNPCC, is a hereditary condition that increases the probability of developing colon and rectal cancer and to a lesser extent cancer of the endometrium, ovary, stomach, small intestine, hepatobiliary tract, pancreas.**

**-Lesch-Nyhan syndrome. Lesch-Nyhan syndrome (LNS) is the most severe form of hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HPRT) deficiency, an inherited disorder of purine metabolism associated with overproduction of uric acid (UA), neurological disability and behavior problems.**

**-Myoclonic epilepsy syndrome**

**associated with ragged red fibers, known for short as MERRF syndrome for its acronym in English (myoclonic epilepsy with ragged red fibers), is a rare mitochondrial disease that occurs mainly with myoclonus and epilepsy.**

**Turcot syndrome, also called "brain tumor and polyposis syndrome" or "glioma and polyposis syndrome", is an inherited disorder characterized by the**

**development of malignant neoplasms in the central nervous system (for example, glioblastoma multiforme or medulloblastoma) associated with polyposis.**

**-Cowden syndrome (CS) is an underdiagnosed and difficult to recognize genodermatosis characterized by the presence of multiple hamartomas in various tissues and a high risk of**

**breast, thyroid, endometrial, kidney and colorectal cancer.**

**-Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a rare autosomal dominant disease that affects young patients and consists of a predisposition to develop a wide range of tumors. The risk of developing a second cancer, especially a radiation-induced cancer, is high.**

**-Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a neurodegenerative mitochondrial disease that affects the optic nerve and is characterized by sudden loss of vision in young adults who are carriers.**

**-Leber's congenital amaurosis (LCA) is a disease of the retina (retinopathy) of genetic origin, characterized by a severe visual deficit in children from the first**

**months of life. Severe loss of both rods and cones occurs throughout the retina from birth.**

**Genetic defects. People with albinism usually suffer from visual impairment to the extent of partial blindness, although few are totally blind. Leber congenital amaurosis can cause total blindness or severe vision loss from birth or infancy.**

**-Cohen's syndrome is a rare disease of**

**genetic origin that is transmitted in an autosomal recessive pattern. It is characterized by the association of obesity, hypotonia, mental retardation, microcephaly, typical craniofacial dysmorphism, as well as large and protruding central incisors, with thin spindle-shaped fingers.**

**-Cockayne syndrome (CS) is a multisystem disease characterized by**

**short stature, characteristic facial appearance, premature aging, photosensitivity, progressive neurological dysfunction, and intellectual disability.**

**-Gardner syndrome is a variant of familial adenomatous polyposis (FAP), it is an autosomal dominant disease characterized by numerous adenomatous polyps on the intestinal mucosal surface,**

**which have a high potential for malignancy.**

**-Peutz-Jeghers syndrome is a genetic condition that causes the development of non-cancerous tumors in the digestive system. The tumors, called hamartomatous polyps, usually develop in the small intestine. They can also develop in the stomach or large intestine.**

**-Gorlin-Goltz syndrome (GGS) is an autosomal dominant hereditary disorder that predisposes mainly to the proliferation of tumors such as basal cell carcinomas and maxillary keratocysts. It is caused by mutation of the Patched gene located on chromosome 9.**

**-Familial adenomatous polyposis (FAP) is a rare hereditary disease that is included**

**among the intestinal polyposis syndromes, characterized by the appearance of a large number (more than 100 in the classic form) of adenomatous polyps (benign tumors) in the colon and rectum from the 20s or 30s**

**“ In the last two decades, numerous mutations in both mtDNA and nDNA have been identified as the cause of a**

**significant number of clinical mitochondrial syndromes. Identical clinical symptoms and signs can be caused by different mutations in mitochondrial or nuclear genes, and the same mutation can produce completely different phenotypes. Among these we find multisystemic diseases framed in clearly defined syndromes (Leigh syndrome, NARP, MELAS, MERRF, Kearns-Sayre, Pearson, chronic**

**progressive external ophthalmoplegia, depletion), with involvement of a single organ (Leber hereditary optic neuropathy, deafness), or with diseases that are named for the affected organs. Epidemiological analyzes have been carried out to assess the prevalence of mitochondrial disease and, although these are rare diseases, they have a significant impact on the community and families. Early diagnosis of these**

**diseases is a very important challenge. On the other hand, since the end of the 1990s, it has been observed that the genetic variation of mtDNA is a relevant factor in the development of multifactorial diseases associated with age and longevity, and evidence is accumulating about the role of mutations in mtDNA and cancer development.**

**It is very difficult to summarize the challenge of the therapeutic treatment of**

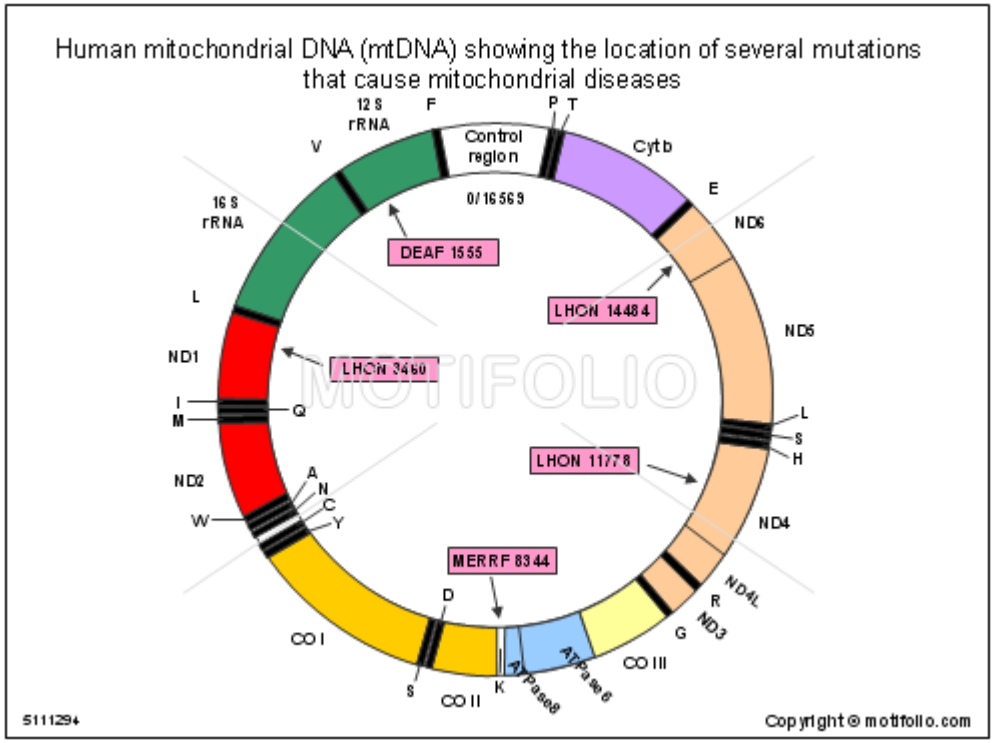
**mitochondrial diseases since they are composed of a heterogeneous group of phenotypes that encompass all types of medical specialties. For this reason, therapeutic strategies are diverse and specific, and a "magic treatment" to treat all diseases is inconceivable. Most of the available treatments are symptomatic and supportive. Symptomatic treatments are mainly based on drugs, blood transfusions,**

**surgery, dietary measures and physiotherapy. Pharmacological treatment can be specific (for example in the treatment of epilepsy), non-specific (antioxidants, electron acceptors and donors, cofactors, etc.), or restricted (avoid drugs known to be toxic to the mitochondria). Despite such limited possibilities, symptomatic treatments should be offered as they can have an impact on the course and outcome of the**

disease”. ( Julio Montoya. Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology. University of Zaragoza).

**The mitochondrial genome has many advantages for studying evolutionary relationships: Due to its smaller size, the study of mtDNA is easier than that of nuclear DNA; it can also be extracted in large quantities, because each cell has several mitochondria . mtDNA evolves faster and does not recombine, passing**

**between generations intact except for mutations; facilitating the identification of relationships between very similar organisms.**


Human mitochondrial DNA (mtDNA) showing the location of several mutations that cause mitochondrial diseases
12 S rRNA
F
P
T
Control region
Cyt b
E
ND6
ND5
L
S
H
ND4
ND4L
R
ND3
G
CO III
ATPase 6
ATPase 8
K
CO II
S
D
CO I
W
A
N
C
Y
ND2
I
M
Q
ND1
L
16 S rRNA
V
0/16569
DEAF 1555
LHON 14484
LHON 3460
LHON 11778
MERRF 8344
MOTIFOLIO
5111294
Copyright © motifolio.com

**Human mitochondrial DNA mtDNA showing the location of various mutations that cause mitochondrial diseases.**

## Chapter 2. MATERIAL AND METHOD.

# Material.

**In our study, blood samples were taken by venipuncture from 68 patients with different degrees of varicocele:**

**The classification in degrees according to Dubin-Amelar is divided into 4 different degrees :**

- **GRADE 0 OR SUBCLINICAL : corresponds to the presence of a varicocele in a man that can only be diagnosed by ultrasound, either Doppler or normal testicular, or by some other diagnostic imaging method.**
- **GRADE 1 : degree of varicocele that corresponds to the presence of a**

varicocele that is only palpable when the patient performs Valsalva maneuvers (maneuvers that seek to increase intra-abdominal pressure, thereby raising venous pressure and promoting the appearance of varicocele )

- GRADE 2 : corresponds to a degree of varicocele in which the doctor is able to palpate the presence of the varicose veins of the pampiniform plexus that

define the varicocele without the need for the patient to perform Valsalva maneuvers.

- GRADE 3 : degree of varicocele in which the urologist or family doctor who is usually faced with the diagnosis of this disease can visualize the varicocele without the need for palpation, only through direct visualization.

**Pathological classification types and degrees of varicocele according to macro and microscopic characteristics. For this idea we will base ourselves on the Nistal-Regadera study that classifies the different degrees of varicocele into 3 fundamental ones:**

- **Spermatic varicocele: it is the degree of varicocele that is produced by the formation of varices or accumulations of venous blood in the anterior part of**

**the pampiniform plexus. This grade of varicocele is usually the most frequently found in routine clinical practice and corresponds to less advanced Dubin grades (grades 0, 1 and 2). These same scientists subdivide this degree of varicocele into 2 different types: diffuse spermatic varicocele (if the entire anterior pampiniform plexus is affected and completely surrounds the entire**

testicle) and focal spermatic varicocele (if only some portions of the spermatic plexus are affected ). anterior pampiniform, so that there are dilated veins and veins that are not).

- Cremasteric varicocele: it is the degree of varicocele in which the lesion occurs in the posterior pampiniform plexus in such a way that only the tail and the posterior part of the testicle are affected.

- **Mixed varicocele: it is the degree of varicocele in which we find lesions of the two previous types, of the anterior plexus and the posterior pampiniform plexus. It usually appears in advanced stages of varicocele that usually correspond to grade 3 according to the Dubin classification .**

**All diagnosed through physical examination, scrotal venous flowmetry and seminogram.**

## The seminogram:

**With alterations in the characteristics of the spermatozoa:**

- **Oligoasthenozoospermia : Impairment of count and mobility.**
- **Asthenoteratozoospermia : morphology and mobility affectation.**

- **Oligoasthenoteratozoospermia : involvement of the three parameters, count, mobility, and morphology.**

**samples were obtained from patients with varicocele associated with infertility. Mitochondrial DNA studies were performed on all of them**

**in the genetics and testicular biopsy laboratories.**

**METHOD.**

**Complete hemochemical study.**

**Genetic study of mitochondrial DNA .**

**Scrotal venous flowmetry.**

**Seminograms.**

**Testicular biopsy.**

**The seminograms were carried out following the recommendations of the WHO (WHO, 1987; WHO, 1992). The samples were obtained in sterile plastic containers after a period of abstinence of three to five days and the condition of fever or the taking of**

**drugs in the previous three months was recorded. The loss of some portion of the sample and the time elapsed before its arrival at the laboratory were also noted. Color, odor and consistency characteristics were described.**

**After 30 minutes in an oven at 37 ºC, the volume (ml) was measured in calibrated tubes, the pH (by means of reactive strips) and the study of the cellular variables of the seminogram was carried out, which included the percentage of progressive**

**spermatozoa, vertical progression , the concentration of spermatozoa and round cells and the percentages of vital and abnormally shaped gametes.**

**The determination of the percentage of progressive spermatozoa was carried out by bright**

**field optical microscopy (400 X) in a drop of fresh semen placed on a slide and the spermatozoa were classified according to the WHO criteria. The percentage of spermatozoa with linear and fast progressive motility (a), those with progressive, curvilinear**

**and lazy motility (b), those that moved but did not move (c) and finally those that were immobile (d) were recorded. The spermatozoa belonging to groups a and b constitute the percentage of progressive spermatozoa. A percentage greater than or equal to**

**50% of progressive spermatozoa is considered a sample with normal motility, between 25 and 49 is taken as moderate asthenozoospermia and below 25 as severe asthenozoospermia.**

**Vertical progression (mm) was determined by measuring by light microscopy the displacement of the spermatozoa (the length traveled by the set of the best spermatozoa in the sample, not individual gametes) in a vertical capillary tube filled with 4.8**

**dextrose serum. % after 30 minutes at 37 $^{o}$C.**

**The percentage of abnormal spermatozoa was determined in fresh semen. Abnormalities were recorded in the head (macrocytic, microcytic**

**and sharp), the midpiece and the flagellum (coiled and double). The number of round cells in fresh semen was also assessed.**

**These techniques were adapted from the same ones for the determination of enzymatic activity in**

**muscle homogenate supernatant enriched in mitochondria (Barroso et al., 1993). Given the impossibility of obtaining a supernatant of sperm homogenate enriched in mitochondria for the high number of samples that were intended to be processed, due to**

**the requirements of the study (determination of mtDNA levels per cell and identification of the mitochondrial haplogroup) and the time required and difficulties in carrying it out (Mclean et al., 1993), we carried out the study in total**

**sperm homogenate. Before we carried out the validation of the technique for this sample.**

**Our strategy consisted of a simplification of one of those used up**

**to now, consisting of the amplification of the entire mitochondrial genome in several fragments and cut with a battery of restriction enzymes (Torroni et al., 1992). We follow a hierarchical protocol, given the existence of specific polymorphisms**

**of the haplogroups. A similar strategy has subsequently been followed by some of the pioneer groups in the study of mitochondrial haplogroups (Macaulay et al., 1999).**

## Chapter 3. CLINICAL TRIAL.

# DNA damage and varicocele.

**The spermatogenesis it is a process complex by which the cell germinal masculine proliferate Y mature through _ of**

**meiosis of diploid spermatogonia to haploid sperm. Although a small percentage of sperm of fertile men has levels detectable of damage in the dna, that can occur in any step of spermatogenesis (21, 22), a higher degree of DNA. Fragmentation is clearly associated with male infertility.**

**Many factors, including intra- or extratesticular factors, may be involved in this process (21, 23). Abnormal chromatin packing, abortive apoptosis Y production extreme of oxygen reactive species (ROS) are factors that can lead to DNA damage (24-26). In addition,**

**extra testicular factors such as age, drugs, smoking, inflammation of the genital tract , factors hormonal, varicocele, and hyperthermia testicular I know find Come in the reasons main for the damage of DNA (24).**

**A variety of methods have been used to assess**
**The integrity of sperm chromatin and DNA. For the evaluation of the main proteins associated with**
**DNA, researchers commonly use chromomycin A3**
**(CMA3) Y staining with blue of aniline. Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nickel dUTP Labeling (TUNEL), the trial of kite, dispersion of**

**sperm chromatin**
**(SCD), acridine orange (AO) and sperm**
**The trial of structure of chromatin (SCSA) I know uses for him DNA.**
**The revision current I know center in the relation between factors testicular internal involved in damage in the DNA Y its relationship with the varicocele.**

**Assessment of DNA damage has been proposed.**
**as additional information on sperm quality and is a forecaster of potential of fertility. In the previous section, several factors involved in the damage of DNA have been discussed. The management of infertility**
**the mens with elderly damage to the DNA spermatic remain high, particularly in individuals with a varicocele. Some**

**studies have reported sperm DNA fragmentation to be significantly higher in individuals with varicocele compared to those with normal semen parameters (50, 61). Furthermore, DNA damage is associated with spontaneous fertilization rate, pregnancy, and pregnancy outcome after ART (62, 63)**

**It is important confirm Yes the varicocele the repair can resolve DNA damage induced by varicocele or factors involved in the damage of DNA spermatic.**
**A lots of studies suggest that the repair of varicocele should**
**be realized in mens infertile that have clinical analysis of varicocele Y semen abnormal (8, 64).**
**Despite this consensus, the question of whether the varicocele should repair in**

**people with the damage to the DNA follow being controversial. In a trial perspective , Smit et al. have stated that the percentage of the SCSA DNA index was reduced three months post-varicocele repair (14). Furthermore, Azadi et al.**
**(44) Y Zini et to the. (65) showed the effect Beneficial of varicocele repair in DNA damage spermatic human.**

## Chapter 4. PRELIMINARY EVIDENCE.

**Previous studies have not found a significant reduction in the damage of DNA three months after of varicocele already repaired.**

**They propose that the duration of the spermatogenic**

**the cycle it is of about 64 days, by it So, the reduction of**

**the fragmentation of DNA must be evaluated six months after repair _ varicocele.**

**Considering is description general of the works of research,**
**We suggest that I know perform the repair of varicocele in individuals with varicocele who have high fragmentation of DNA**
**in your semen samples before surgery.**

## CHAPTER 5. DEVELOPMENT AND DISCUSSION.

**Varicocele is considered one of the main etiologies of male infertility. Along with altered semen parameters, increased DNA fragmentation is thought to play an important role in the induction of varicocele in infertility. The damage of DNA can result of factors inside or extratesticular. Among these, apoptosis, abnormal chromatin packing and**

**oxidative stress are the most investigated . Significant evidence suggests that varicoceles have a deleterious effect on testicular function, and a varicocelectomy not only prevents the progressive decline in testicular function , but also reverses the damage. Without embargo, the degree in that the repair of varicocele improves pregnancy rates and the success of assisted reproductive technology (ART) remains**

**controversial. Varicocele repair in DNA fragmentation is also discussed .**
**( Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D. and Marziyeh Tavalaee, M.Sc.)**

**Varicocele was diagnosed by palpation of the spermatic cord with the patient standing, lying down and during the Valsalva maneuver. Venous blood reflux was confirmed by duplex Doppler ultrasound (Toshyba Nemio SSA-550A Diagnostic Ultrasound System). The subjects were included to perform a**

**varicocelectomy using the microsurgical subinguinal technique, ligating all the dilated veins, preserving the arteries and lymphatic glands. Simultaneously, a homolateral testicular biopsy (TESE) was performed to obtain a sample for pathological anatomy and analysis of FADN in intratesticular sperm.**

**DNA fragmentation analysis**

**FAD was performed on fresh semen samples prior to surgery and testicular samples obtained by extracting sperm from the testicle, using the chromatin dispersion test described by Fernández et al in 2003 [14]. It is a method of**

**denaturation and lysis of nuclear proteins, based on the principle that sperm whose DNA is intact will produce a dispersion halo that corresponds to the chromatin released from proteins, which can be easily analyzed by optical fluorescence microscopy. To do this, we use the commercial Halosperm ® kit from**

**Halotech Dna15. Values of up to 27 ± 11% in the FADN index are usually considered normal in fertile and normozoospermic men. The semen sample was collected by masturbation after 2-3 days of abstinence. Fresh samples were processed following the protocol described in the Halosperm ® kit .**

**In the testis, we extracted sperm from small amounts of biopsied tissue. To do this, we pressed several times on the sample using tweezers, and resuspended with a 1 ml pipette. We removed the tissue and centrifuged at 600 g for 5 minutes. We discarded the supernatant and resuspended in 50 µl of *buffer***

**, sterile phosphate saline. We take 10 µl and observe the presence of sperm under a microscope. From this point, we follow the protocol described above.**

**-In the 68 patients we were guided by**

**their African-American maternal origin following the established criteria of the *World Health Organization* and different investigations showing racial disparities in semen analysis.**

**-We studied individuals aged between 25 and 35 years of age.**

**-The exclusions were, undeclared race or ethnicity, testicular surgery, chromosomal abnormalities, absence**

**of vas deferens, previous consumption of testosterone or previous chemotherapy or radiotherapy treatments.**

**-The mitochondrial DNA studied in these groups of humans showed that the mitochondrial simple nucleotide polymorphisms that have been accumulating in individuals during evolution and that persist in**

**populations in the form of different haplotypes and could play a role in susceptibility male population genetics to infertility.**

**-The testicular function affected by the varicocele is observed in the spermatogenesis of all the cases**

**studied.**

**The most common finding in semen analyzes was an increase in pathological forms of sperm, decreased motility, and decreased semen density.**

**-The testicular biopsy in the 68 patients with varicocele was**

**performed and different abnormalities were observed in all the samples.**

**The most common finding was Leydig cell dysfunction in 8 cases, decreased number of spermatogonia in 54 patients, and germinal epithelial edema in 6 patients.**

**- The male causes of infertility in all**

**cases, was asthenospermia first followed by oligospermia, the most frequent alterations found in the spermiogram. In 68 of the men, a cause of infertility was found, either due to the result of two or more consecutive spermiograms or due to the finding of varicocele.**

**-According to semen analysis, the**

**main alterations found were asthenospermia in 50 patients and oligospermia in 18 of the patients, with asthenospermia being the most frequent and associated with the diagnosis of varicocele.**

**-For male infertility, the prevalence of risk mitochondrial DNA in infertile men was significantly higher.**

**Altered mitochondrial DNA decreased sperm motility and the rate of normal morphology. In addition, the impact on male infertility is confirmed.**

**- Ultrasound:**

**It was the most used method for imaging diagnosis, but it does not provide a quantitative evaluation.**

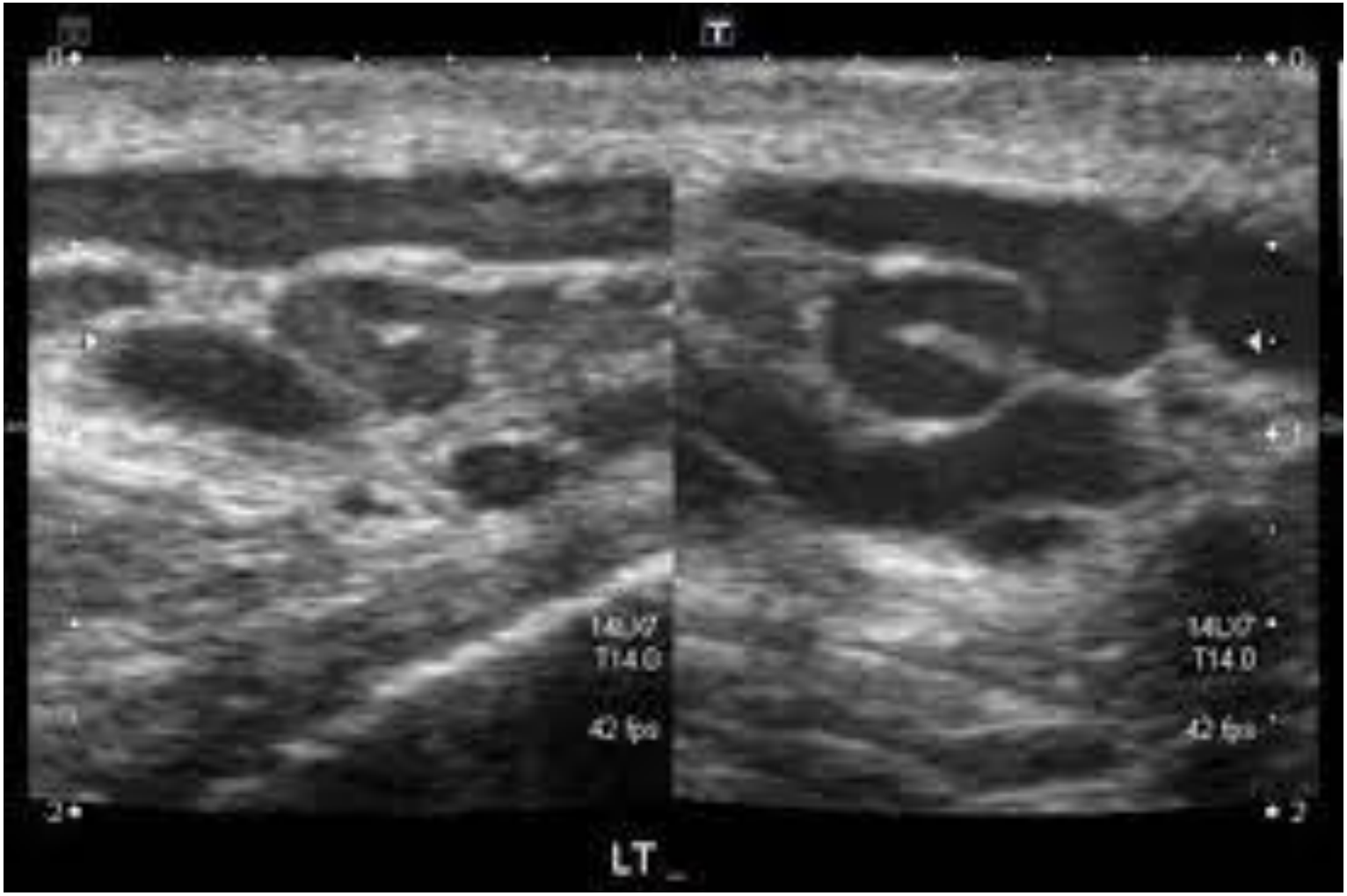
**The appearance of color Doppler ultrasound allowed us to determine and measure both the direction and the**

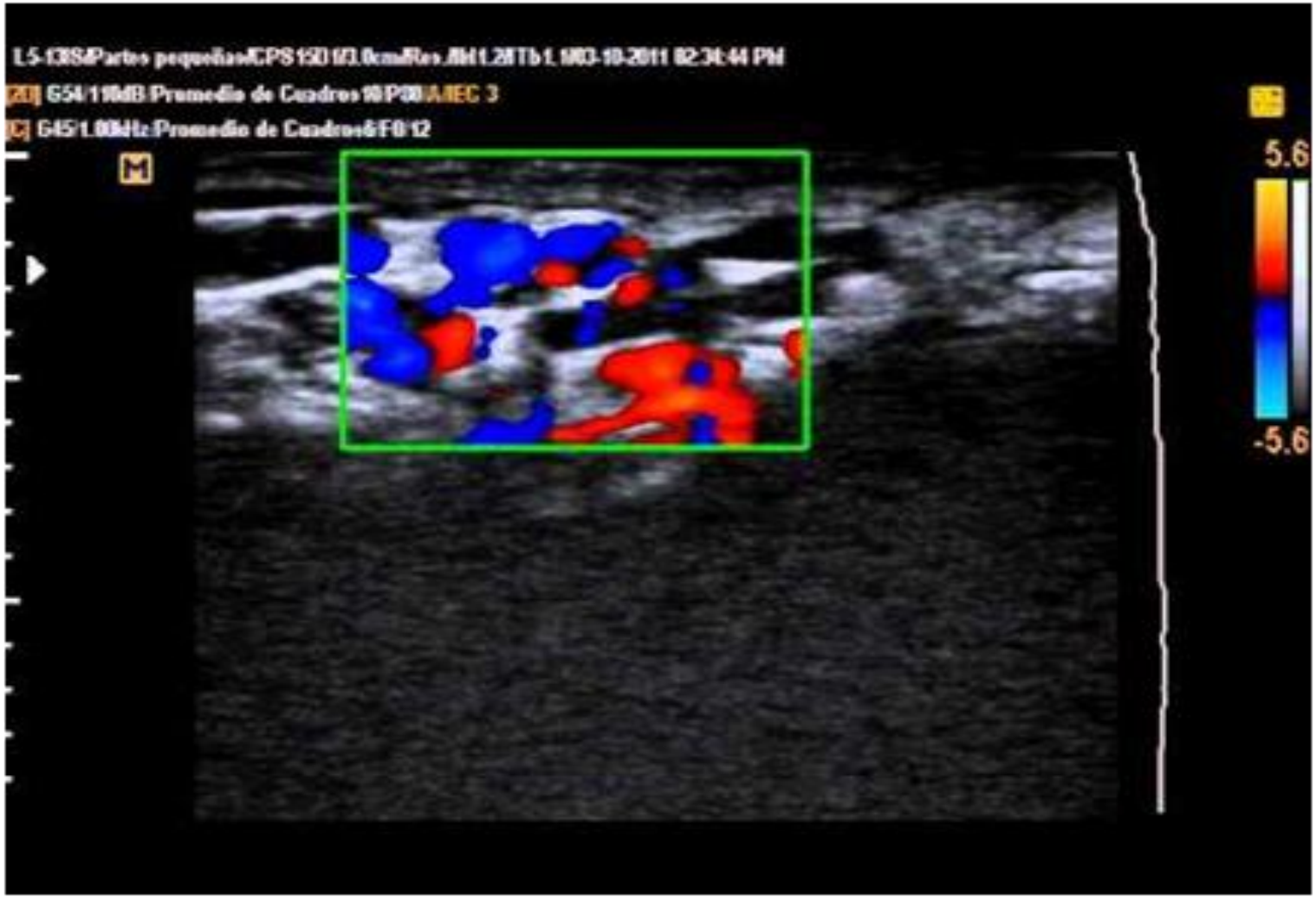
**speed of blood flow.**

**The testicle is observed in great detail using this technique .**

**The preservation of the images obtained**

**allowed a comparative follow-up with those we performed after treatment.**


T
14L07
T14.0
42 fps
14L07
T14.0
42 fps
LT


5.6
-5.6

**CONCLUSIONS.**

**In the 68 patients with different degrees of varicocele:**

**The association between the DNA mitochondrial and sperm motility.**

**-ASTENOZOOSPERMIA it was the base that**

**related to the underlying mitochondrial DNA.**

**-IT WAS THE ASSEMBLY OF THE HAPLOGROUP, AND NOT A BRANCH PARTICULARLY, THE ONE ASSOCIATED WITH ASTENOZOOSPERMIA MODERATE.**

**-THE DISTRIBUTION OF MITOCHONDRIAL HAPLOGROUPS IT WAS CONSIDERED REPRESENTATIVE OF THE GENERAL POPULATION.**

**-THE BIOCHEMICAL PHENOTYPE ASSOCIATED WITH MOTILITY SPERMATIC TO MITOCHONDRIAL GENETIC BACKGROUND IT IS THE RESPIRATORY FUNCTION.**

## RECOMMENDATIONS.

**-We suggest that I know perform the repair of varicocele in individuals with varicocele who have high fragmentation of Mitochondrial DNA associated with male infertility in their semen samples before surgery.**

**- An annual control with ultrasound of the testicular volume is recommended, since it is the most precise and reproducible method to measure the variations in the size of the testicle.**

**Variations of more than 2 ml or 20% of the volume by ultrasound is currently the best indicator of testicular damage**

## BIBLIOGRAPHIES AND ANNEXES.

**1-Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, and Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. Hum Play 1993; 8: 1863-1868.**

**2-Ford WCL and Harrison A. The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. J Reprod Fertile 1981; 63:**

**271-278.**

**3-Ford WCL, Whittington K, and Williams AC. Reactive oxygen species in human suspensions: Production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. Int J Androl 1997; 20:44-49.**

**4-Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: Mitochondrial mutations and**

**degeneration of the optic nerve. VisionRes 1997; 37: 3495-3507.**

**5-Howell N, Bogolin C, Jamieson R, Marenda DR, and Mackey DA. mtDNA mutations that cause optic neuropathy: How do we know? Am J Hum Genet 1998; 62: 196-202.**

**6-Howell N. Human mitochondrial diseases: Answering questions and**

**questioning answers. Int Rev Cytol 1999; 186: 49-116.**

**7-Howell N and Bogolin Semejkal C. Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: Hypermutacion as an apparent consequence of simple-repeat expansion/contraction. Am J Hum Genet 2000; 66: 1589-1598.**

**8-Hrudka F. Cytochemical demonstration of cytochrome oxidase - an objective vitality test of spermatozoa. Dev Growth Differ 1986; 28: 89.**

**9-Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. Int J Androl 1987; 10: 809-828.**

**10-Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, and Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. Urology 1995; 46: 545-549.**

**11-Hu G and Thilly WG. Multi-copy nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA reveal recent acute genetic changes in the human genome. Curr**

**Genet 1995; 28: 410-414.**

**12-Huizinga HA, Korver S, McDaniel BT, and Politiek RD. Maternal effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproduction traits. Livest Prod Sci 1986; 15:11-26.**

**13-Huszar G, Vigue L, and Corrales M. Sperm creatine kinase activity in fertile**

**and infertile oligospermic men. JAndrol 1990; 11:40-46.**

**14-Huszar G, Vigue L, and Morshedi M. Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: A blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. Fertil Steril 1992; 57: 882-888.**

**15-Huszar G and Vigue L. Imcomplete development of human spermatozoa is associated with creatine phophokinase concentration and abnormal head morphology. Mol Reprod Dev 1993; 34: 292-298.**

**16-Huszar G and Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human**

**spermatozoa. JAndrol 1994; 15: 71-77.**

**17-Huszar G, Patrizio P, Vigue L, Willets M, Wilker C, Adhoot D, and Johnson L. Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. JAndrol 1998; 19:11-20.**

**18-Hutchin T and Cortopassi G. Mitochondrial DNA haplotype predicts deafness risk. Am J Med Genet 1994; 55: 1-8.**

**19-Ianello RC, Young J, Sumarsono S, Tymms M, and Kola I. A model for understanding gene regulation during spermatogenesis: The mouse testis Pdha-2 promoter. Reproduced Fertil Dev 1995; 7: 705-712.**

**20-Iida T and Kobayashi S. Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in Drosophila embryos. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11274-11278.**

**21-Ikeda S and Ozaki K. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II).**

**Biochem Biophys Res Commun 1997; 235: 291-294.**

**22-Iñiguez C, Arenas J, Montoya J, Mostacero E, López del Val J, and Morales F. Deficit in the mitochondrial respiratory chain can present as multiple sclerosis. Neurology 1998; 13: 199-203.**

**23-Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Hum Play 1998; 13:33-44.**

**24-Iwasaki A and Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57: 409-416.**

**25-Izaguirre N and de la Rúa C. An mtDNA analysis in ancient basque populations: Implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic expansion from southwestern europe. Am J Hum Genet 1999; 65:199-207.**

**26-Jacobs HT. Structural similarities between a mitochondrially encoded polypeptide and a family of prokaryotic respiratory toxins involved in plasmid**

**maintenance suggest a novel mechanism for the evolutionary maintenance of mitochondrial DNA. J Mol Evo 1991; 32: 333-339.**

**27-Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Pongratz DE, Müller-Höcker J, Jedele KB, Meitinger T, and Gerbitz KD. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase**

**(COX) deficiency shows tRNA Ser (UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. J Med Genet 1998; 35: 895-900.**

**28-James AM, Sheard PW, Wei YH, and Murphy MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. Implications for**

**neurodegenerative and mitochondrial DNA diseases. Eur J Biochem 1999; 259: 462-469.**

**29-Jansen RPS and de Boer K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. Mol Cell Endocrinol 1998; 145: 81-88.**

**30-Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, and Gyllesten**

**U. Mitochondrial mutation rate revisited: Hot spots and polymorphism. Nat Genet 1998; 18: 109-110.**

**31-Konstantinov YM, Lutsenko GN, and Podsosonny VA. Genetic functions of isolated maize mitochondria under model changes of redox conditions. Biochem Mol Biol Int 1995; 36: 319-326.**

**32-Krakauer DC and Mira A. Mitochondria and germ-cell death. Nature 1999; 400: 125-126.**

**33-Krakauer DC and Mira A. Reply to Perez GI. Nature 2000; 403: 501.**

**34-Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, Ericsson SA, and Prins GS. Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh,**

**24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. JAndrol 1993; 14: 374-384.**

**35-Krause W. Contribution of andrological factors to sterility. Andrology 1996; 28: 15-17.**

**36-Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, and Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions**

**using phorbol esters and formyl peptides: Relationship with motility and fertilization in vitro. Fertil Steril 1994; 62: 599-605.**

**37-Krings M, Stone A, Schmitz RN, Krainitzki N, Stoneking M, and Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. Cell 1997; 90: 19-30.**

**38-Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, and Pääbo S. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. Proc Natl Acad Sci 1999a; 96: 5581-5585.**

**39-Krings M, Salem AH, Bauer K, Geisert H, Malek AK, Chaix L, Simon C, Welsby D, Di Rienzo A, Utermann G, Sajantila A, Pääbo S, and Stoneking M mtDNA analysis of nile valley river populations:**

**A genetic corridor or a barrier to migration?. Am J Hum Genet 1999b; 64: 1166-1176.**

**40-Krzyzosiak J, Molan P, and Vishwanath R. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. Anime Reprod Sci 1999; 55: 163-173.**

**41-Ku CY, Lu Q, Ussuf KK, Weinstock GM, and Sanborn BM. Hormonal regulation of cytochrome oxidase subunit messenger RNAs in rat Sertoli cells. Mol Endocrinol 1991; 5: 1669-1676.**

**42-Kullikauskas V, Blaustein D, and Ablin R. Cigarette smoking and its possible effects on sperm. Fertil Steril 1985; 44: 526-528.**

**43-Lamminen T, Huoponen K, Sistonen P, Juvonen V, Lahermo P, Aula P, Nikoskelainen E, and Savontaus ML. mtDNA haplotype analysis in finnish families with Leber hereditary optic neuroretinopathy. Eur J Hum Genet 1997; 5: 271-279.**

**44-Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, and Gray MW. An**

**ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 1997; 387: 493-497.**

**45-Lapena AC. Haplogroups of mtDNA and human asthenozoospermia. Doctoral Thesis. Veterinary school. Zaragoza's University. 1999.**

**46-Larsson NG and Clayton DA. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. Annu Rev Biochem 1995; 22: 151-178.**

**47-Larsson NG, Oldfors A, Garman JD, Barsh GS, and Clayton DA. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. Hum Mol Genet 1997; 6: 185-191.**

**48-Lestienne P, Reynier P, Chrétien MF, Penisson-Besnier I, Malthièry Y, and Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. Mol Hum Reprod 1997; 3: 811-814.**

**49-Leuzzi V, Carducci Ca, Lanza M, Salvetti M, Rostori G, Di Giovanni S, and Torroni A. LHON mutations in italian**

**patients affected by multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1997; 96: 145-148.**

**50-Lezza AMS, Boffoli D, Scaccoo S, Cantatore P, and Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977 bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. Biochem Biophys Res Commun 1994; 205: 772-779.**

**51-Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, and Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. Trends Genet 1997; 13: 450-455.**

**52-Liu DY and Baker HWG. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 465-483.**

**53-Loft S, Astrup A, Buemann B, and**

**Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. FASEB J 1994; 8: 534-537.**

**54-Playán-Ariso AM. Molecular diagnosis of mitochondrial DNA diseases. doctoral thesis Veterinary school. Zaragoza's University. 1999.**

**55-Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JKV, Markowitz SD, Trush MA,**

**Kinzler KW, and Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors. Nat Genet 1998; 20: 291-293.**

**56-Pollak JK and Sutton R. The differentiation of animal mitochondria during development. Trends Biochem Science 1980; X: 23-27.**

**57-Poulton J. Transmission of mtDNA: Cracks in the bottleneck. Am J Hum Genet 1995; 57: 224-226.**

**58-Poulton J and Marchington DR. Prospects for DNA-based prenatal diagnosis of mitochondrial disorders. Prenatal Diag 1996; 16: 1247-1256.**

**59-Poulton J, Macaulay V, and Marchington DR. Is the bottleneck cracked? Am J Hum Genet 1998a; 62: 752-757.**

**60-Poulton J and Marchington D. Reply to Chinnery et al. Am J Hum Genet 1998b; 63: 1910-1911.**

**61-Poyton RO and McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial**

**genomes. Annu Rev Biochem 1996; 65: 563-607.**

**62-Prades A, Calafell F, Budowle B, Bertranpetit J, and Martínez-Jarreta B. Sequence analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) control region in Aragon (North Spain). An anthropological view. Progress Forensic Genet, 1999.**

**63-Premkumar E and Bhargava PM. Transcription and translation in bovine spermatozoa. Nature 1972; 240:139-143.**

**64-Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nat Genet 1993; 4: 289-294.**

**65-Przyrembel H. Therapy of mitochondrial disorders. J Inher Metab Dis 1987; 10: 129-146.**

**66-Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K, and Santachiara-Benerecetti AS. Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. Nat Genet 1999; 23: 437 441.**

**67-Race HL, Herrmann RG, and Martin W. Why have organelles retained genomes?. Trends Genet 1999; 15: 364-370.**

**68-Rando JC, Pinto F, González AM, Hernández M, Larruga JM, Cabrera VM, and Bandelt HJ. Mitochondrial DNA analysis of northwest african populations reveals genetic exchanges with european, near-eastern, and sub-saharan**

**populations. Ann Hum Genet 1998; 62:531-550.**

**69-Rao B, Soufir JC, Martin M, and David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 1997; 24:127-134.**

**70-Reid FM, Vernham GA, and Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation**

**in a maternal pedigree with sensorineural deafness. Hum Mutat 1994; 3: 243-247.**

**71-Reid FM, Rovio A, Holt IJ, and Jacobs HT. Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation. Hum Mol Genet 1997; 6: 443-449.**

**72-Reynier P, Chrétien MF, Savagner F, Larcher G, Rohmer V, Barrière P, and Malthièry Y. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252: 373-377.**

**73-Reynier P, Penisson-Besnier I, Moreau C, Savagner F, Vielle B, Emile J, Dubas F, and Malthièry Y. mtDNA haplogroup J: A contributing factor of optic neuritis. Eur J Hum Genet 1999; 7: 404-406.**

**74-Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A, Papiha S, Hedges R, Bandelt HJ, and Sykes B. Paleolithic and neolithic lineages in the european**

**mitochondrial gene pool. Am J Hum Genet 1996; 59: 185-203.**

**75-Tulloch WS. A consideration of sterility factors in the light of subsequent pregnancies: Subfertility in the male. Trans. Edinburgh Obstet. Soc 59:29, 1952**

**76- MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. Fertil Steril 1965; 16:735.**

**77-Brown JS. The varicocele as related to fertility. Fertil Steril 18:46, 1967**

**78- Dubin L and Amelar RD. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. Urology 10:446, 1977**

**79- Braedel HU et al. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele (University of Saarland, Germany). J.Urol 1994; 151:62-66.**

**80- Kondoh N. et al. Significance of subclinical varicocele detected by scrotal sonography in male infertility: a preliminary report (Osaka University, Japan). J.Urol 1993;1158-1160.**

**81- Dennison, AR; Tibbs, DJ: “Varicocele and varicose veins compared. A basis for logical surgery”. Urology, 28: 211, 1986.**

**82-Braedel, H.U.; Steffens, J.; Ziegler, M. et al.: “A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele”. J. Urol., 151: 62, 1994.**

**83- Shafik, A.; Moftah, A.; Olfat, S. et al.: "Testicular veins: anatomy and the role in varicocelogenesis and other pathologic conditions". Urology, 35: 175, 1990.**

**84- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaría L. Obstruction of the tubuli recti and ducti efferents by dilated veins in the testis of men with varicocele and its possible role in causing atrophy of the**

**seminiferous tubules. Int J Androl 1984; 7: 309-323.**

**85- Nistal M, Redondo E. Varicocele, histology and etiopathogenesis. In: III National Congress of Andrology. Zaragoza: ASESA; 1987. 59-92.**

**86- Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: Cortisol and cathecholamines.**

**Fertil Steril 1974; 25: 88-95.**

**87- Glezerman M, Rakowszczyk M, Lunderfeld B, Been R, Goldman B. Varicocele in oligospermic patients: pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein. J Urol 1976; 115: 562-565.**

**88- Terquem A, Dadoune JP. Morphological findings in varicocele: an ultrastructural study of 30 bilateral testicular biopsies. Int J Androl 1981; 4: 515-531.**

**89- Comhaire F, Simons M, Kunnen M, Vermeulen L. Testicular arterial perfusion in varicocele: the role of rapid sequence scintigraphy with technetium in varicocele evaluation. J Urol 1983;**

**130: 923-926.**

**90-Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwaser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. Fertil Steril 1995; 63: 120-124.**

**91-Hargreave TB. Varicocele: overview and commentary on the results of the World Health Organization varicocele**

**trial. In: Waites GMH, Frick J, Baker GWH. Current advances in andrology. Proceedings of the V th International congress of Andrology. Monduzzi, Bologne, 31-34.**

**92- Rageth JC, Unger C, DaRunga D. Long-term results of varicocelectomy. Urol Int 1992; 48: 327-331.**

**93- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II Pathophysiology of varicocele in male infertility. Hum Reprod Update 2001;7:473-81**

**94- Sikka SC: Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1996; 1:e78–e86.**

**95-Kodama H, Ymaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997; 68: 519–524.**

**96- Saleh RA, Agarwal A: Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. JAndrol 2002; 23: 737–752.**

- **ANNEXES.**

**MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR**

**DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN DE POSTGRADO.**

**Solicitud de Aspirantura de la ACC**

1. Título del Tema: APLICACIÓN DE LA GENETICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

2. Modalidad: Tiempo Parcial.
3. programa o problema de la ciencia y técnica al que pertenece al tema
   PROGRAMA NACIONAL N0. 3 ENFERMEDADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES.

4. Nombre del Propuesto:.MAURICIO MARTI BRENES

   a) Categoría Docente Otorgada: Profesor Asistente de UROLOGÍA PROFESOR PRINCIPAL DE LA ASIGNATURA.
   b) Categoría Científica: Edad: Fecha de Nacimiento. Edad. 48 años Fecha d e nacimiento 31. 10. 1955

   c) Centro de Trabajo: Facultad de Ciencias Dr. Miguel Enríquez.
   Dirección: Ramón Pinto No. 202 entre Ensenada y Villanueva. Luyano, Ciudad de la Habana.
   Teléfono: 98'8543. 99'4847

5. Cargo que ocupa y breve descripción de la labor que realiza:

**Cargos:**

- VICEDECANO DOCENTE de la Facultad de Ciencias Médicas. DR. Miguel Enríquez.
- Especialista de Primer Grado en Urología.
- Profesor Asistente de Urología
- Miembro Titular de la Sociedad Cubana de Urología

AI DUAL CAMERA

***MINISTERIO DE SALUD PUBLICA***
***DIRECCIÓN DE RELACIONES INTERNACIONALES***

*Ciudad de La Habana, 16 de agosto del 2005.*

*A la Honorable Embajada de España :*

*El Ministerio de Salud Pública a través de su Dirección de Relaciones Internacionales, solicita visa de estancia por 90 dias a favor del viajero:* ***MAURICIO MARTI BRENES, Pasaporte Ordinario No. c690188.***

*Viaja a España el 15 de septiembre del presente año a:* ***TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS, ABORDAR PARTE EXPERIMENTAL DEL PLAN DE TRABAJO.***

***Itinerario:*** *Habana / Zaragoza / Habana*

***Nota:*** *La parte que invita correrá con los gastos del viaje .*

*Aprovecho la oportunidad para expresarle el testimonio de mi más alta y distinguida consideración y estima.*

*Dr. Raúl Gómez González*
*Jefe Departamento de Trámites y Protocolo*

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
SALUS POPULI SUPREMA LEX
Relaciones Internacionales

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular
Miguel Servet 177
50013 Zaragoza
Spain
Telephon 34-76-761642
Fax 34-76-761612
e-mail: lopezper@posta.unizar.es

Manuel J. López-Pérez

31 de julio de 2005

Estimado Dr. Martí,

En relación con la colaboración que mantenemos entre su grupo de investigación y el nuestro, sería muy interesante para el desarrollo del mismo que Vd. pudiera desplazarse a Zaragoza para que pudiéramos abordar la parte experimental del plan de trabajo. Los gastos de desplazamiento y estancia correrían de nuestra parte, al igual que el seguro médico que será tramitado por nuestro país. Entiendo que dado el trabajo previsto exige analizar las secuencias de muchas muestras, el plan previsto solo sería realizable en un periodo de al menos dos meses.

Para ello le ruego reciba mi invitación a realizar una estancia en este Departamento desde principios de septiembre hasta finales de Octubre, fechas en las que el laboratorio está más disponible de espacio. De esta forma la tesis podría ser finalizada para su presentación final a su vuelta a La Habana. Las fechas concretas dependerán de las disponibilidades de pasajes.

Atentamente

Manuel J. López Pérez

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular
Miguel Servet 177
50013 Zaragoza
Spain
Telephon 34-76-761642
Fax 34-76-761612
e-mail: lopezper@posta.unizar.es

Manuel J. López-Pérez

Manuel José López Pérez, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza, emite el siguiente Informe sobre la estancia realizada por el Dr. D. Mauricio Martí Brenes en su laboratorio:

El Dr. Martí ha realizado una estancia de trabajo experimental en mi laboratorio de la Universidad de Zaragoza desde el 9 de Octubre al 8 de Noviembre de 2004. Durante la misma ha realizado las técnicas de extracción y aislamiento de DNA a partir de diferentes muestras biológicas, y más en particular de muestras de sangre. Además, hemos estado discutiendo las líneas de desarrollo de un proyecto de investigación a realizar en colaboración entre ambos y que sustentaría el desarrollo de su tesis doctoral.

El proyecto a desarrollar consistiría básicamente en estudiar variantes mutacionales del DNA mitocondrial que pueden afectar a la motilidad espermática, en una población cubana control y que ha estado afectada de varicocele. En nuestro laboratorio, hemos comprobado que variantes poblacionales caucásicos del DNA mitocondrial presentan una motilidad espermática menor. En particular, el haplogrupo T, y los subhaplogrupos U4, U1811 y U5 A1, están concentrados en individuos astenozoospérmicos. El objetivo del proyecto planteado pretende estudiar si variantes genéticos de este tipo, u otros que puedan estar presentes en población cubana con línea materna afroamericana, (y por consiguiente, con otros tipos de variantes) podían favorecer la astenozoospermia asociada al varicocele.

La línea de colaboración planteada y mencionada anteriormente resulta del mayor interés para este laboratorio, y puede aportar nuevas evidencias de una predisposición genética poblacional relacionada con el DNA mitocondrial para una astenozoospermia.

Zaragoza a 4 de Noviembre de 2004

Fdo. Manuel José López Pérez

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR
FACULTAD DE VETERINARIA

SHOT ON REDMI 7
AI DUAL CAMERA

*Ministerio de Salud Pública*
*Dirección Jurídica*

*23 entre N y O, Edificio Soto, Vedado*
*Ciudad de la Habana, C.P.10400*
*Cuba*

LIC. TANIA MARIA GARCIA CABELLO, DIRECTORA JURIDICA DEL MINISTERIO DE SALUD PUBLICA DE LA REPUBLICA DE CUBA, POR LA PRESENTE,----------

CERTIFICO: Que el Dr. MAURICIO MARTÍ BRENES

Docente y Profesor Principal de Urologia, de dicha Facultad; señalándose que en enero de 2004 obtiene la categoría docente de Profesor Asistente y; en enero de 2005, con la presentación y publicación del trabajo "Infertilidad masculina a partir del ADN mitocondrial en pacientes con varicocele"

Y para que así lo pueda acreditar donde corresponda y surta efecto fuera del territorio nacional, expido la presente a los 28 días del mes de julio del año 2008.----------

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
SALUS POPULIS
SUPREMA LEX
DIRECCIÓN JURIDICA

Dr. Nicolás Fernández Montoto, Lda. María de los Angeles Montalvo Carrió, Lda. Tania M. García Cabello, Asesores Jurídicos del Ministerio de Salud Pública, por la presente:

CERTIFICO: Que la firma del funcionario que antecede es autentica por la semejanza que guarda con la que acostumbra a usar en sus actos oficiales

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de julio del 2008

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
SALUS POPULIS
SUPREMA LEX
DIRECCIÓN JURIDICA

*Números de teléfono: (537) 55 3355, (537) 55 3373*

**DRA. ANA GLORIA SOSA CÁCERES**
**SECRETARIA GENERAL**
**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA**

Dpto. Archivo, Títulos y Certificaciones Secretaría General

***CERTIFICO QUE:*** Según antecedentes que obran en el expediente, de Post-Grado, perteneciente al Doctor **MAURICIO MARTI BRENES.**

Y a solicitud de la CONSULTORIA JURÍDICA INTERNACIONAL, a los efectos de utilizarla fuera del Territorio Nacional, autorizada con el Sello Oficial del Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, se expide la presente en Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los diez días del mes de julio del año dos mil ocho.....

Folio: 214 5.5

Dr. Nicolás Fernández Montoto, Lda. María de los Angeles Montalvo Carrió, Lda. Tania M. García Cabello, Asesores Jurídicos del Ministerio de Salud Pública, por la presente:

CERTIFICO: Que la firma del funcionario que antecede es auténtica por la semejanza que guarda con la que acostumbra a usar en sus actos oficiales

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de julio del 2008

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA SALUS POPULI SUPREMA LEX DIRECCIÓN JURÍDICA

La Habana, 31 JUL 2008

Visto por este Consulado General de España a la fecha del documento, por ser el parecer auténtico.

30890

REPÚBLICA DE CUBA MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DIRECCIÓN DE ASUNTOS CONSULARES Y DE CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR

LA HABANA 29 JUL. 2008

REPÚBLICA DE CUBA MINISTERIO DE FINANZAS Y PRECIOS 20 VEINTE PESOS ONAT

REPÚBLICA DE CUBA MINISTERIO DE FINANZAS Y PRECIOS 20 VEINTE PESOS ONAT